

Metaboliti Tossici dell'ALC-0315: Criticità Farmacocinetiche e Regolatorie in un “Vaccino a mRNA” contro il COVID-19

Gabriele Segalla, PhD

Chimica pura, (Chimica organica biologica), specialista in chimica delle microemulsioni e sistemi colloidali, Chief Scientist of Multichem R&D Italy, email: gabriele.segalla@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5969-3732>

Abstract

L'ALC-0315, il lipide cationico ionizzabile che abilita la piattaforma LNP del vaccino Comirnaty di Pfizer, è presentato nei dossier regolatori come se il suo destino metabolico fosse lineare e pienamente controllato. La nostra analisi, invece, identifica una discrepanza basilare e di rilievo, che non dovrebbe mai sfuggire durante la preparazione né tantomeno nella revisione della documentazione: il prodotto di idrolisi previsto dalla struttura chimica di ALC-0315 è *acido 2-esildecanoico* (α -ramificato), tuttavia le principali sottomissioni di Pfizer richiamano ripetutamente la presenza del distinto isomero *6-esildecanoico* (non disponibile in commercio, non riconosciuto come standard analitico nei protocolli stabiliti). Si tratta di una errata identificazione materiale, con dirette conseguenze sulla sicurezza e sulla conformità. Il vero metabolita, l'acido 2-esildecanoico, occultato da Pfizer e mascherato come acido 6-esildecanoico, possiede una classificazione *H410* (*molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata*), mentre il “fantomatico” isomero 6-esil risulta privo di alcuna classificazione di pericolo e viene presentato come teoricamente più degradabile. In uno studio preclinico cardine a supporto della CMA, la sostituzione del 2-esil con un isomero 6-esil non classificato compromette materialmente la ricostruzione della clearance, la tracciabilità e ogni rivendicazione difendibile di validazione GLP per il vaccino Pfizer. Il secondo prodotto di degradazione (una trialcanolamina, $pK_a \approx 9,6$) è soggetto a sequestro lisosomiale, ostacolando così la clearance; tuttavia, il dossier aziendale offre solo una limitata documentazione sulla sua destinazione. Criticamente, il dataset farmacocinetico non rende conto adeguatamente della biodistribuzione della dose ed è fondato su standard di test insufficientemente documentati — o omessi. Considerata la scala dell'esposizione (miliardi di soggetti) e le potenziali conseguenze oncologiche e cardiologiche legate a queste criticità PK, tali omissioni non sono semplicemente sfortunate: sono del tutto inaccettabili. Di conseguenza, chiediamo una rivalutazione indipendente, metodologicamente trasparente e pienamente controllabile da revisori esterni del metabolismo e della clearance di ALC-0315, nonché la revisione di tutte le decisioni regolatorie riguardanti il medicinale Comirnaty, alla luce di quella che appare come un'omissione grave e rilevante nelle procedure di verifica.

Parole chiave: *ALC-0315, ionizable lipid, lipid nanoparticles, LNP, COVID-19, mRNA vaccine, ribosomal frameshifting.*

1. INTRODUZIONE

Gli studi farmacocinetici (PK), in particolare quelli condotti su modelli animali da laboratorio,

costituiscono un prerequisito essenziale e obbligatorio per l'ottenimento dell'autorizzazione all'immissione in commercio (AIC) di qualsiasi nuovo farmaco o vaccino. Essi rappresentano la pietra angolare della fase preclinica, consentendo la definizione del profilo di sicurezza e la previsione del comportamento fisiologico dei componenti della formulazione nell'organismo umano. In particolare, l'analisi metabolica sia dei principi attivi (API) sia degli eccipienti nei modelli animali è fondamentale, poiché permette ai ricercatori di determinare se il sistema biologico trasforma l'agente in metaboliti attivi, inattivi o tossici prima dell'avvio della sperimentazione clinica nell'uomo.

Per i medicinali destinati all'uso umano, i principali quadri regolatori in Europa comprendono:

1. [Direttiva 2001/83/CE](#) : Il testo legislativo fondamentale per i medicinali ad uso umano, che stabilisce l'obbligo di presentare un dossier completo di prove farmacotossicologiche (Allegato I) come prerequisito per ottenere un'AIC.
2. [Regolamento \(CE\) n. 726/2004](#): disciplina le procedure comunitarie per l'autorizzazione e la vigilanza dei medicinali e istituisce l'Agenzia europea per i medicinali (EMA).

ALC-0315 (denominazione chimica: [(4-hydroxybutyl)azanediyl]di(hexane-6,1-diyl) bis(2-hexyldecanoate); n. CAS 2036272-55-4) rappresenta un costituente fondamentale del vaccino Comirnaty di Pfizer/BioNTech e svolge un ruolo critico nell'internalizzazione endosomiale delle nanoparticelle lipidiche (LNP) e nella successiva traslocazione citosolica dell'mRNA in seguito alla somministrazione intramuscolare (EMA, 2021).

Il pKa apparente di ALC-0315 (6,09) è intrinsecamente subottimale per l'applicazione intramuscolare e per un'efficiente trasfezione (Hassett et al., 2019; Segalla, 2023b), discostandosi dalle conclusioni riportate dall'EMA (2021, p. 42). Il suo pKa intrinseco (9,6) implica un elevato grado di protonazione citosolica, che è correlato all'induzione di citochine pro-infiammatorie e alla generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Yu et al., 2020; Patel et al., 2021; Ndeupen et al., 2021; Segalla, 2023a, 2023b, 2024).

Inoltre, ALC-0315 non è incluso nella Farmacopea europea e non compare nell'inventario UE C&L (classificazione ed etichettatura). Di conseguenza, la sostanza non presenta alcun numero di registrazione REACH identificabile né una classificazione CLP pubblicamente tracciabile. In termini pratici, ciò significa che il suo profilo tossicologico complessivo non è ufficialmente stabilito — né per la sostanza in quanto tale, né per le sue nanoforme all'interno delle nanoparticelle lipidiche (Segalla, 2023a).

La presente revisione critica si concentra sull'analisi degli studi farmacocinetici e metabolici presentati da Pfizer all'EMA nell'agosto 2020, finalizzati all'ottenimento dell'autorizzazione all'immissione in commercio subordinata a condizioni concessa il 21 dicembre 2020. Tali studi, condotti da Pfizer e successivamente avallati da EMA e FDA, sono descritti nel rapporto intitolato *Investigation of the biotransformation of ALC-0159 and ALC-0315 in vitro and in vivo in rats* (Pfizer 043725, 2020), che fornisce una valutazione qualitativa preliminare della biotrasformazione di ALC-0159 e ALC-0315 nella circolazione sistemica, nelle frazioni epatiche S9 e negli epatociti di modelli murini, di ratto, di scimmia e umani, nonché in campioni di plasma, urina, feci e fegato derivati da saggi farmacocinetici condotti nel ratto.

La presente revisione si concentra sulle incongruenze chimiche, biochimiche e regolatorie che emergono da una valutazione critica dei dati UHPLC–MS/MS di Pfizer relativi ai metaboliti del lipide cationico ionizzabile ALC-0315.

La tecnica nota come UHPLC-MS/MS (cromatografia liquida ad altissime prestazioni accoppiata a spettrometria di massa tandem) combina una cromatografia liquida rapida e ad alta risoluzione con una spettrometria di massa tandem sensibile, al fine di identificare e quantificare composti in ambito farmaceutico, nel monitoraggio ambientale, nella metabolomica e nella diagnostica clinica. Essa consente di separare in modo efficiente campioni complessi e di rilevare analiti specifici, fornendo dati strutturali dettagliati e una quantificazione accurata anche a concentrazioni molto basse, dell'ordine dei picogrammi (Sanjeev et al., 2022; Khan, 2024).

2. L'INGANNO DELLO "STANDARD FANTASMA": FALSIFICAZIONE DOCUMENTALE E OCCULTAMENTO DEL CATABOLITA TOSSICO ACIDO 2-ESILDECANOICO

Secondo Pfizer, le analisi spettrometriche di massa mediante UHPLC-MS/MS indicano che il metabolismo di ALC-0315 procede principalmente attraverso due stadi sequenziali di idrolisi esterica, generando un intermedio monoestere (rapporto massa/carica m/z : 528) e un metabolita de-esterificato in entrambe le funzioni (m/z : 290). Il monoestere è stato identificato nel sangue, nel plasma e nel fegato di ratto, nonché nelle frazioni S9 di scimmia; viceversa, il metabolita de-esterificato in entrambe le funzioni è stato rilevato nel sangue di topo e di ratto, nelle frazioni epatiche S9 di scimmia e nel plasma, nelle urine, nelle feci e nel fegato provenienti da tessuti e fluidi di ratto. Questo metabolita può andare incontro a un'ulteriore biotrasformazione in un coniugato glucuronide (m/z : 466), identificato esclusivamente nelle urine di ratto (Figura 1).

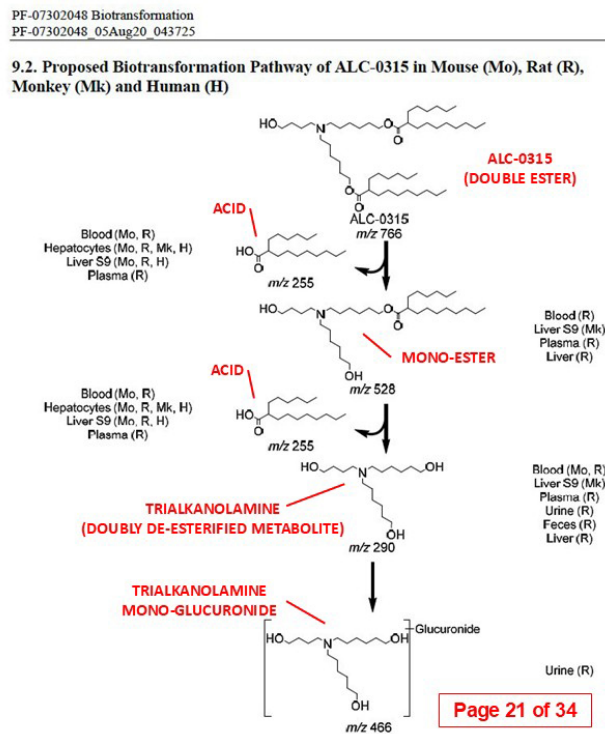
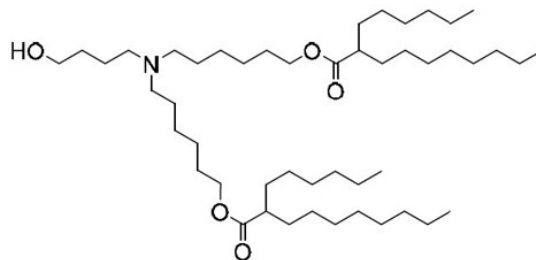


Figura 1. Panoramica schematica della via metabolica di biotrasformazione di ALC-0315 secondo il Rapporto Pfizer PF-07302048_05Aug20_043725.

Pfizer, a pagina 21 del proprio Rapporto Tecnico 043725 (2020), afferma che il metabolita primario risultante dalla de-esterificazione di ALC-0315 è l'acido 6-esildecanoico (m/z 255). Tale rilievo è ulteriormente avvalorato nella Sezione 3, "Materiali e metodi" (pagina 4), nella quale si precisa che lo "standard dell'acido 6-esildecanoico" — la sostanza di riferimento utilizzata per la calibrazione strumentale, la validazione del metodo analitico e la quantificazione dell'ipotetico analita chimicamente designato come acido 6-esildecanoico — è stato acquistato da Millipore-Sigma, St. Louis, Missouri (Figura 2).



ALC-0315

3. MATERIALS AND METHODS

6-HEXYLDECAHOIC ACID

3.1. Materials

ALC-0159 (2-[(polyethylene glycol)-2000]-*N,N*-ditetradecylacetamide, Lot# GALC0159-10), ALC-0315 ((4-hydroxybutyl)azanediyl)bis(hexane-6,1-diyl) bis(2-hexyldecanoate), Lot# GALC0315-11), and Carboxy-MPEG2 (methoxypolyethylene glycol 2000 acetic acid, Lot# 792354-01-011) were obtained from Avanti Polar Lipids, Inc. NAD⁺, reduced NADH, reduced NADPH, NADP⁺, alamethicin, adipic acid, diethylene glycol, triethylene glycol, tetraethylene glycol, myristic acid, tetradecylamine, 6-hexyldecanoic acid, 4-aminobutyric acid, and 6-aminohexanoic acid were obtained from Millipore-Sigma (St. Louis, MO). *N,N*-Ditetradecylamine was obtained from Ambeed (Arlington Heights, IL). All other reagents were the highest grade commercially available.

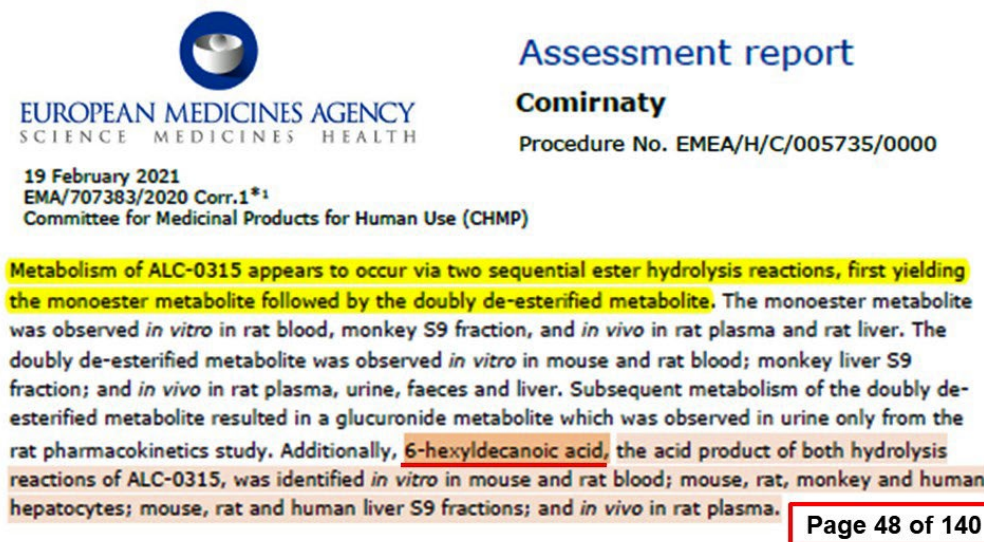
Figura 2. Sezione "Materials and Methods" (da p. 4 Pfizer Report PF-07302048_05Aug20_043725).


La formazione e l'identificazione spettrometrica di massa dell'"acido 6-esildecanoico" risultano parimenti avallate dall'EMA nel proprio *Comirnaty Assessment Report* del 19 febbraio 2021, nel quale si afferma a pagina 48:

...l'acido 6-esildecanoico, prodotto acido di entrambe le reazioni di idrolisi dell'ALC-0315, è stato identificato *in vitro* nel sangue di topo e di ratto; negli epatociti di topo, ratto, scimmia e uomo; nelle frazioni epatiche S9 di topo, ratto e uomo; e *in vivo* nel plasma di ratto (EMA, 2021; Figura 3).

La documentazione prodotta da Pfizer e successivamente accettata dalle autorità regolatorie appare dimostrabilmente fuorviante e priva di un rigoroso fondamento scientifico. Secondo i principi consolidati della chimica organica e il consenso degli esperti, la doppia de-esterificazione della molecola ALC-0315 conduce esclusivamente alla formazione di *acido 2-esildecanoico*, un esito imposto dalla sua

intrinseca architettura chimica. Inoltre, l'isomero "6-esildecanoico" citato dal produttore non è né commercialmente disponibile né riconosciuto come standard per la spettrometria di massa nei protocolli analitici consolidati.




EUROPEAN MEDICINES AGENCY
SCIENCE MEDICINES HEALTH

Assessment report
Comirnaty
Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000

19 February 2021
EMA/707383/2020 Corr.1*1
Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)

Metabolism of ALC-0315 appears to occur via two sequential ester hydrolysis reactions, first yielding the monoester metabolite followed by the doubly de-esterified metabolite. The monoester metabolite was observed *in vitro* in rat blood, monkey S9 fraction, and *in vivo* in rat plasma and rat liver. The doubly de-esterified metabolite was observed *in vitro* in mouse and rat blood; monkey liver S9 fraction; and *in vivo* in rat plasma, urine, faeces and liver. Subsequent metabolism of the doubly de-esterified metabolite resulted in a glucuronide metabolite which was observed in urine only from the rat pharmacokinetics study. Additionally, 6-hexyldecanoic acid, the acid product of both hydrolysis reactions of ALC-0315, was identified *in vitro* in mouse and rat blood; mouse, rat, monkey and human hepatocytes; mouse, rat and human liver S9 fractions; and *in vivo* in rat plasma.

Page 48 of 140

Figure 3. Description of metabolic biotransformation pathway of ALC-0315 according to EMA (Assessment Report Comirnaty, 19 February 2021, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000).

Di conseguenza, l'affermazione relativa all'impiego di una simile sostanza come standard di riferimento non soddisfa i requisiti necessari di accuratezza scientifica e documentale. La nomenclatura IUPAC della molecola progenitrice stessa [(4-hydroxybutyl)azanediyl]di(hexane-6,1-diyl) bis(2-hexyldecanoate) identifica in modo inequivocabile la presenza del gruppo 2-hexyldecanoico. Ciò conferma che lo standard dichiarato non corrisponde al reale catabolita generato mediante l'idrolisi metabolica della molecola. È pertanto motivo di profonda preoccupazione constatare che Pfizer, nell'ambito di procedimenti ufficiali e in tutta la documentazione essenziale per l'ottenimento della CMA, abbia dichiarato di aver utilizzato uno standard di riferimento privo di qualsiasi fondamento nei principi basilari della chimica organica. Una simile affermazione — formalmente riportata in uno studio animale preclinico presumibilmente condotto con tecniche analitiche di elevata precisione — non solo disattende i principi elementari di trasparenza, ma compromette alla radice l'affidabilità delle prove presentate alle autorità regolatorie. Tale circostanza non può né essere trascurata né minimizzata, poiché mina l'integrità del processo di valutazione scientifica e, per estensione, la tutela della salute pubblica. Sorge dunque una questione fondamentale: si tratta di una mera inesattezza documentale o di un errore nomenclaturale, oppure si deve ipotizzare un'omissione deliberata di dati pertinenti finalizzata a occultare informazioni essenziali relative alla sicurezza chimico-fisica e al profilo tossicologico del prodotto sottoposto all'EMA e alla FDA? Tale interrogativo è del tutto legittimo, poiché concerne non soltanto la conformità regolatoria formale, ma la sicurezza di miliardi di individui. L'ipotesi di una condotta dolosa (ossia di "qualsiasi atto illecito, volontariamente e consapevolmente commesso, con l'intento di produrre effetti dannosi") è ulteriormente avvalorata dal fatto che sia Pfizer sia l'EMA erano pienamente consapevoli della presenza dell'acido 2-esildecanoico, e non dell'isomero 6-esildecanoico. Tale informazione era già disponibile dal 2017 nei brevetti che descrivono la produzione di lipidi ionizzabili quali l'ALC-0315, i quali forniscono una descrizione dettagliata della via sintetica del

composto. Tali documenti indicano chiaramente che l'acido 2-esildecanoico costituisce uno dei principali reagenti di partenza impiegati nella sintesi dell'ALC-0315 (Boldyrev et al., 2022; Saadati et al., 2022). Costituisce un principio fondamentale della chimica organica che l'idrolisi di un estere generi l'acido precursore e l'alcol corrispondente. Se l'ALC-0315 è sintetizzato a partire dall'acido 2-esildecanoico, il suo catabolita primario deve necessariamente essere l'acido 2-esildecanoico. La discrepanza risulta ancor più evidente se si confronta il citato Rapporto Pfizer 043725 con il *Nonclinical Evaluation Report* della TGA australiana del 2021. A pagina 11, nella sezione “Novel Excipients”, il rapporto TGA identifica correttamente l'acido 2-esildecanoico quale catabolita in questione (Figura 4).

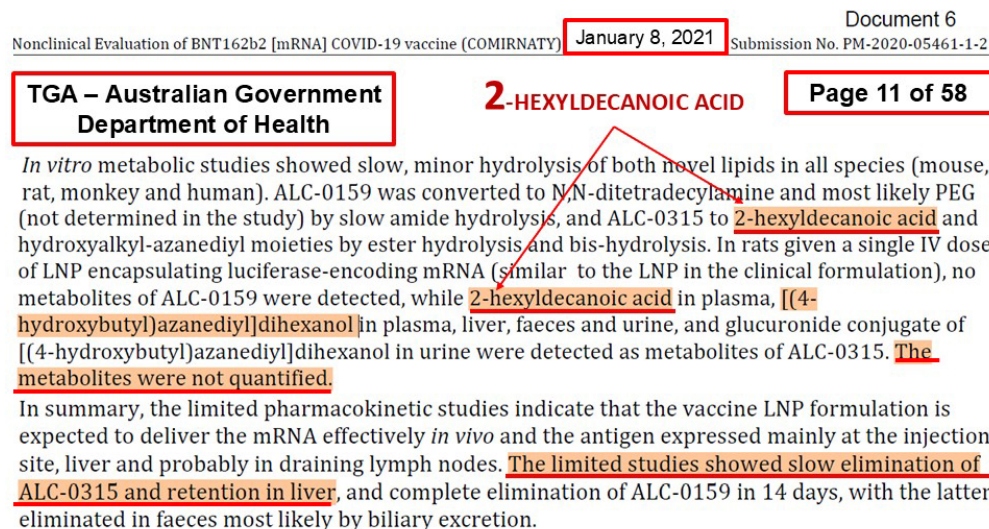


Figura 4. Estratto da: Australian TGA Nonclinical Evaluation Report BNT162b2 [mRNA] COVID-19 vaccine (COMIRNATY), Document 6, datato 8 Gennaio 2021.

In sintesi, il dossier Pfizer del 2020 (presentato e avallato dall'EMA) *PF-07302048_05 Aug 20_043725*, del 5 agosto 2020, descrive saggi di clearance metabolica calibrati mediante un presunto standard di “acido 6-esildecanoico” — un isomero che non risulta apparentemente tracciabile come materiale di riferimento commercialmente disponibile — mentre il *Nonclinical Evaluation Report* della TGA australiana, *BNT162b2 [mRNA] COVID-19 vaccine (COMIRNATY™)*, Submission No: PM-2020-05461-1-2, Sponsor: Pfizer Australia Pty Ltd, dell'8 gennaio 2021, identifica l'acido 2-esildecanoico quale metabolita prodotto dall'idrolisi di ALC-0315. Tale discontinuità documentale difficilmente può essere ricondotta a un mero errore materiale: essa rinvia piuttosto o a una grave negligenza nella costruzione e nella revisione del dossier, oppure a una deliberata riformulazione dell'evidenza metabolica. In entrambi i casi, la conseguenza è la medesima: la trasparenza e la verificabilità dei dati sottoposti alle autorità regolatorie — prerequisiti di una solida valutazione del rapporto beneficio/rischio — risultano materialmente compromesse.

L'utilizzo — o il preteso utilizzo — di uno standard di riferimento non verificabile nella spettrometria di massa costituisce una grave violazione delle buone pratiche di laboratorio (GLP), poiché compromette l'integrità dell'identificazione e della quantificazione fondate sul rapporto massa/carica (m/z) e sul tempo di ritenzione (t_R). In termini pratici, in assenza di uno standard tracciabile e appropriato, né la validazione del metodo né l'assegnazione dell'analita possono essere considerate

solide e affidabili. Di conseguenza, le Tabelle 8.5, 8.6, 8.7 e 8.8 del Rapporto Pfizer 043725 (2020) — che riportano valori di m/z e tempi di ritenzione per il metabolita “fantasma” «acido 6-esildecanoico» (m/z 255.2330) — non possono essere considerate scientificamente corroborate e dovrebbero pertanto essere trattate come inaffidabili sia ai fini della valutazione procedurale sia di quella regolatoria.

Occorre inoltre rilevare, con profonda preoccupazione, che l'unico catabolita autentico generato dall'idrolisi di ALC-0315 — l'acido 2-esildecanoico — è stato sistematicamente occultato nella documentazione presentata da Pfizer e successivamente avallata dall'EMA, nonostante fosse stato correttamente identificato dalla TGA australiana. Tale sostanza (n. CAS 25354-97-6) è classificata nella banca dati ECHA Chemicals, secondo il Sistema Globale Armonizzato (GHS), come sostanza pericolosa, ossia *Aquatic Chronic 1* (H410: *molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata*), nonché *Skin Irrit. 2* (H315: *provoca irritazione cutanea*) e *Skin Sens. 1B* (H317: *può provocare una reazione allergica cutanea*; Figura 5).

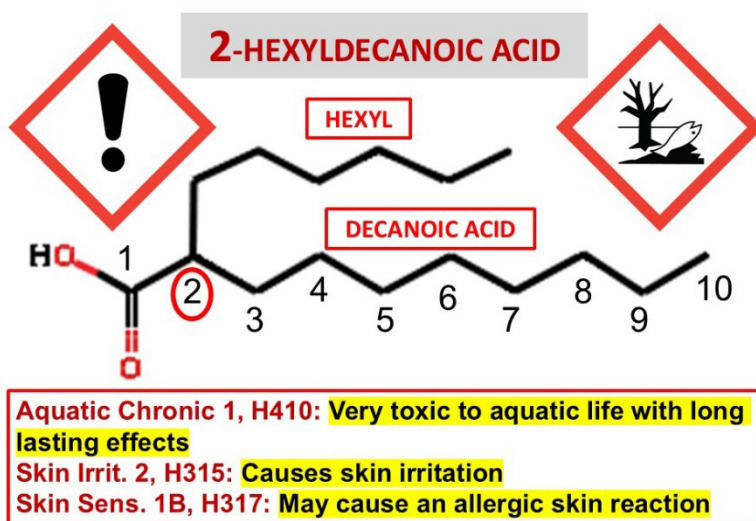


Figura 5. Classificazione tossicologica del 2-hexyldecanoic acid in conformità a Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008.

È imperativo sottolineare che *Aquatic Chronic 1* designa una tossicità acquatica cronica a concentrazioni estremamente basse — una classificazione riservata alle sostanze di massima rilevanza ambientale. Tali composti sono caratterizzati da marcata persistenza e da una limitata suscettibilità alla biodegradazione e, nei sistemi biologici, ai processi enzimatici. Di conseguenza, questa classificazione comporta rilevanti implicazioni regolatorie, tra cui stringenti obblighi di contenimento e, ove siano superate le soglie pertinenti, requisiti specifici per gli impianti che stoccano determinate quantità della sostanza. A titolo contestuale, tra le sostanze rientranti nella classificazione H410 figurano pesticidi ad elevata potenza, nonché talune forme di piombo e di leghe di rame (Regolamento (CE) n. 1272/2008).

In termini pratici, l'acido 2-esildecanoico — il metabolita generato dall'idrolisi intracellulare del lipide cationico ionizzabile ALC-0315 in seguito alla trasfezione — costituisce una sostanza di rilevante pericolosità (dove per “pericolo”, ai sensi della Direttiva 2012/18/UE, si intende la proprietà intrinseca di una sostanza pericolosa o di una situazione fisica, atta a causare danni alla salute umana o all'ambiente), in ragione della sua resistenza alla degradazione metabolica e della conseguente tendenza

al bioaccumulo. Che tali elementi siano stati trascurati oppure soppressi, essi giustificano una seria preoccupazione scientifica. In questo contesto, è legittimo domandarsi se Pfizer, nell'ambito dei propri dossier spettrometrici, metabolici e tossicocinetici, abbia presentato l'“acido 6-esildecanoico” — un'entità presumibilmente meno pericolosa e non verificabile — come “metabolita mascherato” al fine di eludere il profilo tossicologico accertato dell'autentico catabolita, il pericoloso acido 2-esildecanoico.

Un simile approccio potrebbe servire sia a costruire una narrazione di sicurezza apparentemente accettabile, sia, in alternativa, a distogliere l'attenzione da un inibitore metabolico persistente e dannoso. Tale interpretazione è rafforzata da una chiara incongruenza documentale: nel 2020, Pfizer ha descritto saggi di clearance metabolica calibrati con uno standard inerte “6-esil” (ossia nell'ambito delle sottomissioni precedenti alla concessione dell'Autorizzazione all'Immissione in Commercio subordinata a condizioni [CMA]), mentre il *Nonclinical Evaluation Report* della Therapeutic Goods Administration (TGA) australiana, datato 8 gennaio 2021 — pubblicato *dopo* la CMA — identifica esplicitamente l'acido 2-esildecanoico quale metabolita. La cronologia, unitamente al cambiamento di nomenclatura, suggerisce che il vero catabolita fosse noto ma non rappresentato in modo coerente nel dossier regolatorio primario.

Le evidenze attualmente disponibili supportano la conclusione secondo cui l'acido 2-esildecanoico agisce come un potente inibitore enzimatico — una caratteristica che, se valutata con piena trasparenza, avrebbe verosimilmente costituito un ostacolo sostanziale all'approvazione da parte del Comitato per i Medicinali per Uso Umano (CHMP) dell'EMA. Il fondamento meccanicistico è di natura strutturale: la ramificazione esilica in C2 (α) introduce vincoli sterici che non sono presenti nel presunto isomero “fantasma” ramificato in C6 (Figura 6).

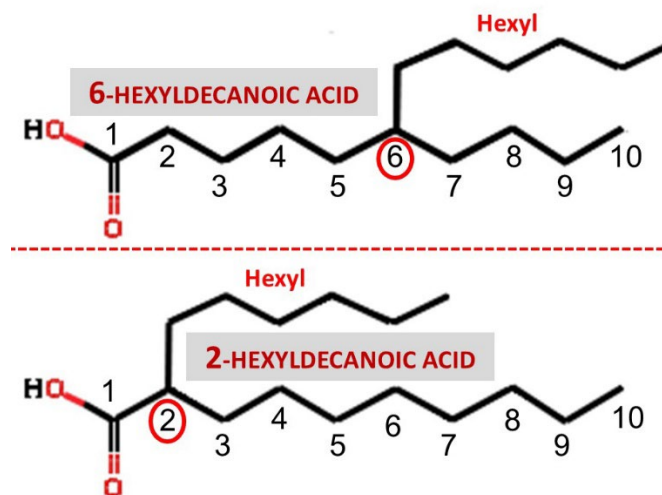


Figura 6. Isomeri strutturali dell'acido esildecanoico e i loro distinti profili di ingombro sterico.

Pfizer riporta l'utilizzo dell'acido 6-esildecanoico come standard di riferimento, ossia un acido grasso ramificato in C6, prontamente metabolizzato attraverso la β -ossidazione mitocondriale. Per contro, il vero catabolita, l'acido 2-esildecanoico, presenta una ramificazione α in C2, che colloca un sostituito esilico in posizione adiacente alla funzione carbossilica. Questa specifica architettura molecolare genera un marcato ingombro sterico che ostacola l'accomodamento del substrato nel sito attivo dell'acil-CoA

deidrogenasi, inibendo così la catalisi (Figura 7) e promuovendo un blocco persistente della β -ossidazione mitocondriale (Fromenty & Pessayre, 1995; Schulz, 2002; Prakash, 2018). Sono precisamente queste caratteristiche strutturali a ridurre la biodegradabilità nell'ambiente acquatico, come riflesso dalla classificazione H410. In termini regolatori, H410 implica persistenza e potenziale bioaccumulo anche a basse concentrazioni. Diversamente dal presunto isomero 6-esildecanoico — privo di un numero CAS tracciabile — l'effettivo catabolita acido di ALC-0315, l'acido 2-esildecanoico (n. CAS 25354-97-6), presenta un profilo di pericolo documentato, ossia *Aquatic Chronic 1*, elevato potenziale di bioaccumulo ($\log P > 6$), scarsa solubilità acquosa e limitata biodegradabilità.

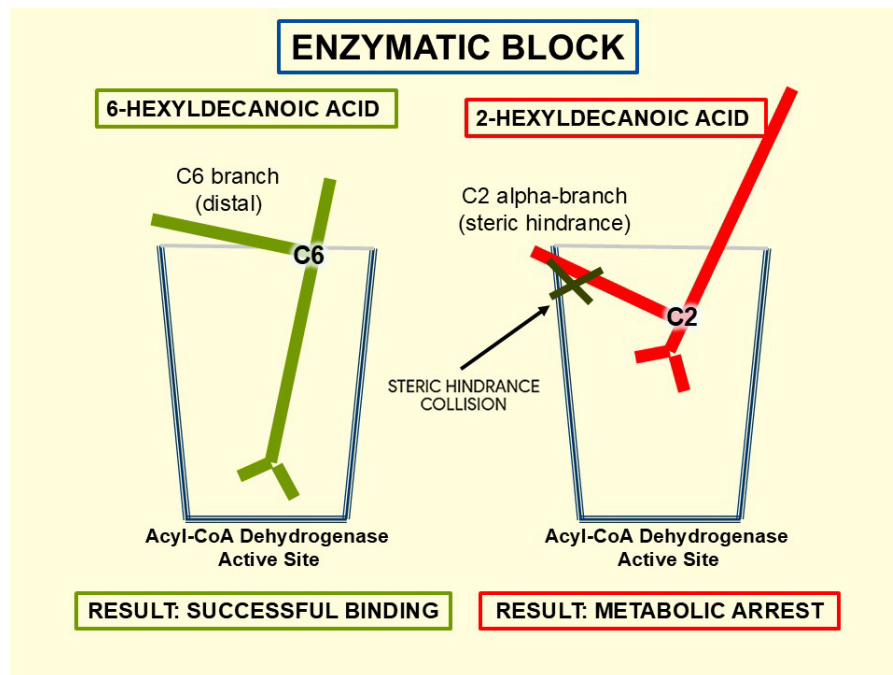


Figura 7. L'acido 2-esildecanoico ramificato in C2 (α) induce un ingombro sterico che limita il docking nell'acil-CoA deidrogenasi, inibendo la β -ossidazione mitocondriale, a differenza dell'acido 6-esildecanoico ramificato in C6.

L'inibizione della β -ossidazione da parte di un acido grasso ramificato può compromettere rapidamente la bioenergetica cellulare limitando la produzione di ATP e perturbando il riciclo di NAD^+ . Il conseguente declino degli equivalenti riducenti (NADH e FADH_2) compromette la catena di trasporto degli elettroni e la fosforilazione ossidativa, promuovendo così la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Hou et al., 2021). A sua volta, la deplezione di ATP nei mitocondri disfunzionali può indebolire l'integrità nucleare, privando la cellula dell'energia necessaria per riparare i danni al DNA indotti dallo stress ossidativo. Inoltre, i ROS possono essere amplificati dalla presenza di nanomateriali e lipidi cationici ionizzabili resistenti alla degradazione citosolica, aumentando ulteriormente il carico tossicologico (Yun et al., 2016; Yu et al., 2020; Segalla, 2023b).

In sintesi, i dossier farmacocinetici e metabolici relativi all'ALC-0315 di Pfizer sollevano sostanziali preoccupazioni etiche e deontologiche e indicano una manifesta violazione delle Good Laboratory Practice (GLP), con le seguenti conseguenze:

1. Mancata identificazione e valutazione del metabolita pericoloso *acido 2-esildecanoico*, classificato come *Aquatic Chronic 1* (H410: *molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata*) e noto per agire come inibitore mitocondriale.
2. Presentazione di una validazione del metodo analiticamente discutibile, che compromette l'integrità, la trasparenza e la riproducibilità dei dati trasmessi alle autorità regolatorie.
3. Omissione di una valutazione tossicologica comparativa della ramificazione in α (C2) dell'*acido 2-esildecanoico*, direttamente correlata all'inibizione enzimatica rispetto agli isomeri dotati di ramificazione distale.
4. Invalidità scientifica delle tabelle spettrometriche riportate nel Rapporto Pfizer 43725, con la potenziale implicazione di una frode procedurale e di una grave violazione dei protocolli GLP.
5. Evidenza che l'EMA abbia avallato la molecola "spur ia" acido 6-esildecanoico (EMA, 2021; Figura 3) senza un rigoroso controllo della tracciabilità e della conformità analitica, conducendo alla pubblicazione di un Assessment Report ufficiale che convalida uno stato chimico implausibile alla luce dei principi fondamentali dell'idrolisi degli esteri.

3.1. LA TRAPPOLA DELLA TRIALCANOLAMMINA

La doppia de-esterificazione di ALC-0315 (Figura 1) genera, oltre a due moli di acido 2-esildecanoico, una mole di un'ammina terziaria idrossilata. Questo catabolita aminico comprende una catena 4-idrossibutilica (con il gruppo ossidrilico in posizione δ , a 4 atomi di carbonio dall'atomo di azoto) e due catene 6-idrossiesiliche (con i gruppi ossidrilici in posizione ζ , a 6 atomi di carbonio dall'atomo di azoto). La sua formula strutturale è $N(C_4H_8OH)(C_6H_{12}OH)_2$, con la designazione chimica *[(4-hydroxybutyl) azanediyl] dihexanol* e un peso molecolare di 289,46 g/mol (Figura 8).

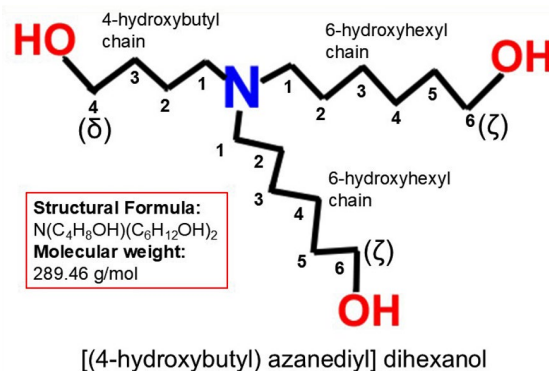


Figura 8. Struttura chimica del catabolita trialcanolamminico generato dall'idrolisi di ALC-0315 (*[(4-hydroxybutyl)azanediyl]dihexanol*; PM 289,46 g/mol).

Per quanto concerne questo metabolita aminico e la corrispondente valutazione spettrometrica di massa, è difficile non rilevare una grave incongruenza nel Rapporto 043725 (2020). Pfizer riporta sia il rapporto massa/carica (m/z 290,2690) sia il tempo di ritenzione (t_R 8,1 min) sotto la voce "Bis-hydrolysis (amine)" e fornisce persino una rappresentazione strutturale accurata della trialcanolammina (Figura 1); tuttavia, il composto è vistosamente assente dall'elenco dei materiali di riferimento certificati (standard) utilizzati per la validazione UHPLC-MS/MS (Figura 2). La presentazione di dati di clearance metabolica relativi a un metabolita in assenza di qualsivoglia standard tracciabile costituisce, nel migliore dei casi, una macroscopica carenza metodologica — e una carenza che non avrebbe mai

dovuto essere lasciata passare senza contestazione in un dossier regolatorio.

Tale omissione priva di qualsiasi credibilità ogni pretesa di identificazione e, ancor più, di quantificazione: in assenza di uno standard certificato, l'assegnazione dell'identità del picco e il calcolo dei livelli tissutali difettano delle minime garanzie analitiche richieste nella tossicologia regolatoria. Ne consegue che le concentrazioni riportate si fondano su assunzioni, piuttosto che su misurazioni validate, mettendo così in discussione l'affidabilità della metodologia impiegata in una fase preclinica che dovrebbe, per definizione, costituire il fondamento probatorio per gli studi sull'uomo e, in ultima istanza, per l'autorizzazione all'immissione in commercio. In continuità con il già allarmante episodio dell'"acido 6-esildecanoico", qui si ripropone il medesimo schema: requisiti essenziali della spettrometria di massa vengono elusi e la conformità alle GLP risulta di fatto ridotta a una mera etichetta formale. Quando manca lo standard di riferimento, la validazione del metodo non è semplicemente indebolita — è nulla, e il dataset risultante non può essere considerato scientificamente affidabile né ai fini della valutazione tossicologica né di quella regolatoria.

Passiamo dunque a ciò che questa omissione finisce di fatto per sottrarre alla vista: le implicazioni meccanicistiche e regolatorie connesse a questo secondo metabolita "fantasma" e le ragioni per cui le evidenze analitiche sottostanti sembrano essere state trattate con una permissività tanto ingiustificata.

Il valore di pKa (costante di dissociazione acida) della trialcanolammina derivante dall'idrolisi di ALC-0315 può essere stimato in modo affidabile mediante il metodo computazionale SPARC (*SPARC Performs Automated Reasoning in Chemistry*) (Hilal et al., 2003). Questo sistema avanzato sfrutta l'architettura molecolare dei composti organici per prevedere con accuratezza diverse proprietà fisico-chimiche, incluso il pKa di acidi e basi. SPARC si fonda su modelli meccanicistici di perturbazione che integrano effetti elettronici, di solvatazione e di legame a idrogeno, fornendo una valutazione dettagliata e rigorosa delle caratteristiche molecolari. Strumenti computazionali di questo tipo sono indispensabili per ottenere dati affidabili e riproducibili, in particolare quando la molecola bersaglio non è disponibile come standard commerciale ed è assente dalle principali banche dati chimiche internazionali.

Il pKa calcolato per il sottoprodotto trialcanolamminico derivante dall'idrolisi di ALC-0315 tiene conto del coefficiente di attenuazione induttiva risultante dalla presenza della catena 4-idrossibutilica (con il gruppo -OH collocato a 4 atomi di carbonio dall'atomo di azoto) e delle due catene 6-idrossiesiliche (con il gruppo -OH collocato a 6 atomi di carbonio dall'atomo di azoto; Figura 8). Tali effetti induttivi, che modulano la capacità di dissociazione della molecola, sono essenziali per una stima realistica del comportamento chimico della trialcanolammina. Sulla base di tali considerazioni, il pKa di questo composto è stimato nell'intervallo compreso tra 9,1 e 9,6. Tale valore determina il suo stato ionico predominante nei diversi compartimenti cellulari e la sua capacità di permeare le membrane biologiche.

Per caratterizzare la distribuzione della trialcanolammina nei diversi compartimenti cellulari, si applica l'equazione di Henderson–Hasselbalch utilizzando i valori di pKa ottenuti mediante il framework computazionale SPARC. Questa relazione quantifica il rapporto di equilibrio tra la forma cationica protonata (BH⁺) e la base neutra (B) in funzione del pH dell'ambiente:

$$[\text{BH}^+]/[\text{B}] = 10^{(\text{pKa} - \text{pH})}$$

Di conseguenza, l'equazione fornisce una stima quantitativa dell'abbondanza relativa delle due specie, consentendo una descrizione rigorosa della *speciazione* del composto dipendente dal pH (ossia della sua distribuzione tra le due specie chimiche sopra definite) e, per estensione, del suo potenziale di compartimentalizzazione.

A pH citosolico ($\approx 7,2$), la speciazione calcolata indica che BH^+ rappresenta dal 98,76% ($pK_a = 9,1$) al 99,60% ($pK_a = 9,6$) della popolazione molecolare della trialkanolamina. La frazione neutra risulta pertanto minima; nondimeno, essa è meccanicisticamente decisiva, poiché soltanto la specie non carica può diffondere attraverso i doppi strati lipidici e mediare la traslocazione intercompartimentale.

Per contro, nel lume lisosomiale ($pH \approx 4,5$), dove l'attività protonica è marcatamente più elevata, la protonazione è essenzialmente quantitativa: BH^+ raggiunge il 99,99% ($pK_a = 9,1$) e si avvicina al 100% ($pK_a = 9,6$). In tali condizioni, la molecola acquisisce una carica positiva quasi permanente che impedisce la retrodiffusione attraverso la membrana lisosomiale, determinando così il fenomeno dell'“intrappolamento ionico” (lisosomotropismo), come vedremo nella sezione successiva.

Per contro, nel lume lisosomiale ($pH \approx 4,5$), dove l'attività protonica è marcatamente più elevata, la protonazione è essenzialmente quantitativa: BH^+ raggiunge il 99,99% ($pK_a = 9,1$) e si avvicina al 100% ($pK_a = 9,6$). In tali condizioni, la molecola acquisisce una carica positiva quasi permanente che impedisce la retrodiffusione attraverso la membrana lisosomiale, determinando così il fenomeno dell'“intrappolamento ionico” (lisosomotropismo), come vedremo nella sezione successiva.

3.2. L'EFFETTO DEL “CANCELLO A SENSO UNICO”

In sintesi, a pH citosolico ($\approx 7,2$), una frazione infinitesimale ($\approx 0,40\% - 1,25\%$) della trialkanolamina si trova nella forma neutra, il che le consente di permeare i doppi strati fosfolipidici e di entrare nei lisosomi. Una volta penetrata nel compartimento lisosomiale, dove il pH è $\approx 4,5$, la molecola incontra una concentrazione di protoni H^+ quasi 1.000 volte superiore. In queste condizioni acide, la protonazione diventa pressoché assoluta ($\approx 100\%$). Nel suo stato completamente ionizzato (BH^+), la trialkanolamina acquisisce una carica positiva permanente che impedisce la retrodiffusione attraverso la membrana lisosomiale — impermeabile agli ioni — con conseguente sequestro nel lume lisosomiale (Figura 9).

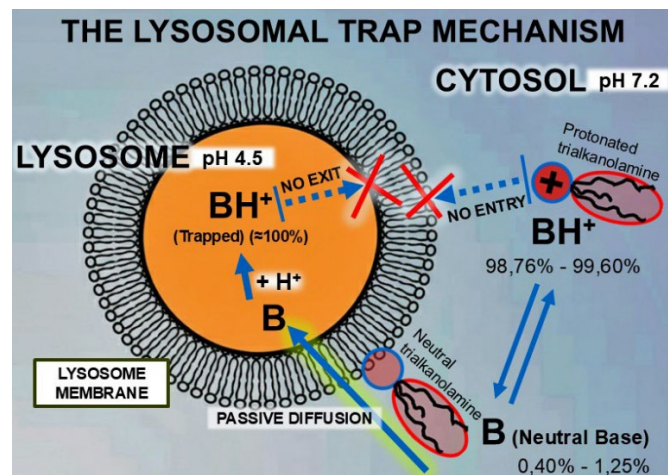


Figura 9. “Intrappolamento ionico” lisosomiale della trialkanolamina: la protonazione dipendente dal pH ne determina il sequestro nel lume lisosomiale e impedisce la retrodiffusione.

Esito: la trialcanolamina sequestrata si lega elettrostaticamente ai fosfolipidi carichi negativamente della membrana lisosomiale, formando complessi lipido-proteici non digeribili. La presenza di tali complessi inibisce gli enzimi lisosomiali, in particolare le fosfolipasi, arrestando così l'autofagia — il processo cellulare essenziale responsabile della degradazione degli organelli danneggiati, quali i mitocondri compromessi dall'acido 2-esildecanoico. Ne consegue una *fosfolipidosi iatrogena* (Anderson e Borlak, 2006), caratterizzata dall'accumulo patologico di lamelle lipidiche all'interno degli organelli e dal blocco totale del flusso autofagico (Figura 10).

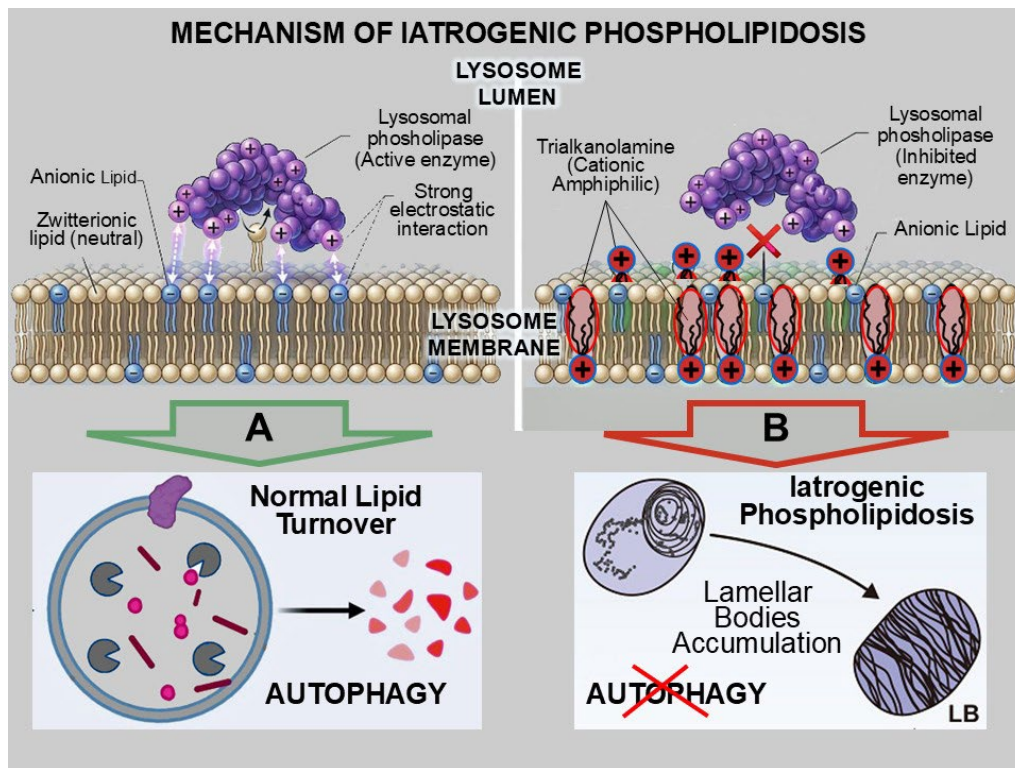


Figura 10. A) La via autofagia-lisosoma: un sistema catabolico intracellulare fondamentale che degrada efficacemente le membrane interne. B) Fosfolipidosi iatrogena: l'accumulo di complessi lipido-proteici non digeribili inibisce le fosfolipasi lisosomiali, bloccando il flusso autofagico.

Il lisosoma non funziona semplicemente come un “recettacolo di rifiuti metabolici”, bensì come il nucleo regolatorio del sistema autofagico. Quando i lisosomi vengono saturati dal carico metabolico dei cataboliti di ALC-0315, l'intera cascata autofagica raggiunge uno stato di congestione funzionale, conducendo a un arresto sistemico. La cellula perde la propria capacità di rinnovamento omeostatico, andando incontro a una forma di “soffocamento fisico”: l'accumulo di detriti biochimici congestiona il citoplasma, perturbando il traffico intracellulare e precipitando una senescenza precoce o la morte cellulare per necrosi/apoptosi.

Queste cellule disfunzionali secernono citochine pro-infiammatorie, favorendo un microambiente infiammatorio cronico che può esacerbare patologie preesistenti o innescare nuovi processi autoimmuni, come ipotizzato negli studi sull'attività adiuvante e sui rischi tossicologici delle

nanoparticelle lipidiche (LNP). Tali evidenze suggeriscono che il danno risultante non rappresenti un evento acuto e transitorio, bensì un processo cumulativo (Segalla, 2023b; Segalla, 2024). Non avendo valutato l'effettiva clearance di questi metaboliti mediante standard di riferimento validi, Pfizer ha significativamente sottostimato il rischio di paralisi autofagica, condannando le cellule a uno stato di “soffocamento” metabolico che è alla base della tossicità cronica e dei rischi a lungo termine associati ai nanomateriali lipidici coniugati a mRNA.

3.3. IL MECCANISMO “DETERGENTE”: DESTABILIZZAZIONE DELLA MEMBRANA NUCLEARE E INFILTRAZIONE NUCLEARE

La conversione del lipide ALC-0315 nel suo catabolita trialcanolamminico rappresenta più di una semplice degradazione: è una profonda metamorfosi chimica. Da una struttura lipidica apparentemente inerte emerge un'ammina terziaria anfifilica caratterizzata da elevata citotossicità.

Il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ($\log P$) costituisce un indicatore primario della lipofilità di una molecola neutra. ALC-0315, caratterizzato da quattro lunghe catene idrocarburiche, è virtualmente insolubile in acqua — un “super-lipide” destinato a rimanere sequestrato all'interno del doppio strato fosfolipidico. Secondo il modello predittivo *XLogP3* (Cheng et al., 2007), il $\log P$ di ALC-0315 supera 12. Tuttavia, l'idrolisi enzimatica (de-esterificazione) rimuove le due catene di acido 2-esildecanoico, lasciando soltanto le corte catene terminali idrossilate (-OH) caratteristiche delle trialcanolammine. Ne deriva una drastica riduzione della lipofilità: il $\log P$ stimato per la trialcanolamina generata si colloca tra 1,5 e 2,5.

Per le molecole basiche ionizzabili, il coefficiente di distribuzione ($\log D$) fornisce una misura più precisa dell'idrofilità a un dato pH, come definito dalla formula:

$$\log D = \log P - \log(1 + 10^{(pK_a - pH)})$$

Con un $\log P$ di ≈ 2 , un pK_a compreso tra 9,1 e 9,6 e un pH citosolico di 7,2, il $\log D$ della trialcanolamina risulta prossimo allo zero o negativo (+0,09 / -0,4). In generale, un valore elevato di $\log D$ indica una maggiore lipofilità, mentre un valore basso o negativo riflette una spiccata idrofilità; un $\log D$ prossimo allo zero identifica una molecola anfifilica facilmente disperdibile nella matrice acquosa del citosol. Il passaggio dal $\log P \approx 12$ di ALC-0315 a un $\log P \approx 2$ e $\log D \approx 0$ del suo metabolita aminico trasforma il lipide progenitore, scarsamente solubile, in un tensioattivo aminico cationico altamente idrodispersibile, capace di solubilizzare e destabilizzare i lipidi cellulari. In ragione del suo basso $\log D$ e della carica netta positiva, la trialcanolamina si comporta come un aggressivo detergente cationico, analogo al bromuro di cetiltrimetilammonio (CTAB), impiegato in ambito laboratoristico per la sua capacità di perturbare le membrane lipidiche.

Mentre la molecola di ALC-0315 rimane in larga misura confinata nella membrana fosfolipidica in ragione della sua imponente architettura lipofila, la trialcanolamina protonata e idrodispersibile migra agevolmente attraverso il citosol. Una volta giunta all'involucro nucleare, la sua natura anfifilica ne facilita l'inserzione tra i fosfolipidi, dove interagisce con le teste fosfolipidiche cariche negativamente mediante la propria carica positiva. Questo processo destabilizza l'involucro nucleare — fenomeno noto come “lipid stripping” (Sudbrack et al., 2011) — e, una volta compromessa la membrana, la trialcanolamina cationica può interagire direttamente con le porzioni di DNA cariche negativamente, potenzialmente ostacolando i meccanismi di trascrizione e di riparazione (Figura 11).

La brusca riduzione del logP da un valore >12 a circa 2 segna una fase critica: il lipide si trasforma da componente puramente strutturale in un composto cationico idrofilo dotato di proprietà tensioattive. Questa transizione consente la destabilizzazione dei doppi strati fosfolipidici, con rilevanti implicazioni citotossiche e genotossiche. La trialcanolamina — caratterizzata da $pK_a \approx 9,6$, $\log P \approx 2,0$ e $\log D \approx 0$ — non è stata rigorosamente caratterizzata da Pfizer, con conseguente sottostima degli effetti di “lipid stripping” esercitati sulle membrane intracellulari, incluso l’involucro nucleare. Tali effetti possono compromettere l’integrità genomica e favorire vie oncogeniche associate all’instabilità della membrana nucleare. Come si è già visto, il primo catabolita di ALC-0315, l’acido 2-esildecanoico, inibisce la β -ossidazione e la catena respiratoria mitocondriale, precipitando una deplezione dell’ATP cellulare. Privata dell’energia metabolica essenziale, la cellula non è in grado di riparare le lesioni del DNA indotte dallo stress ossidativo e dal lipid stripping.

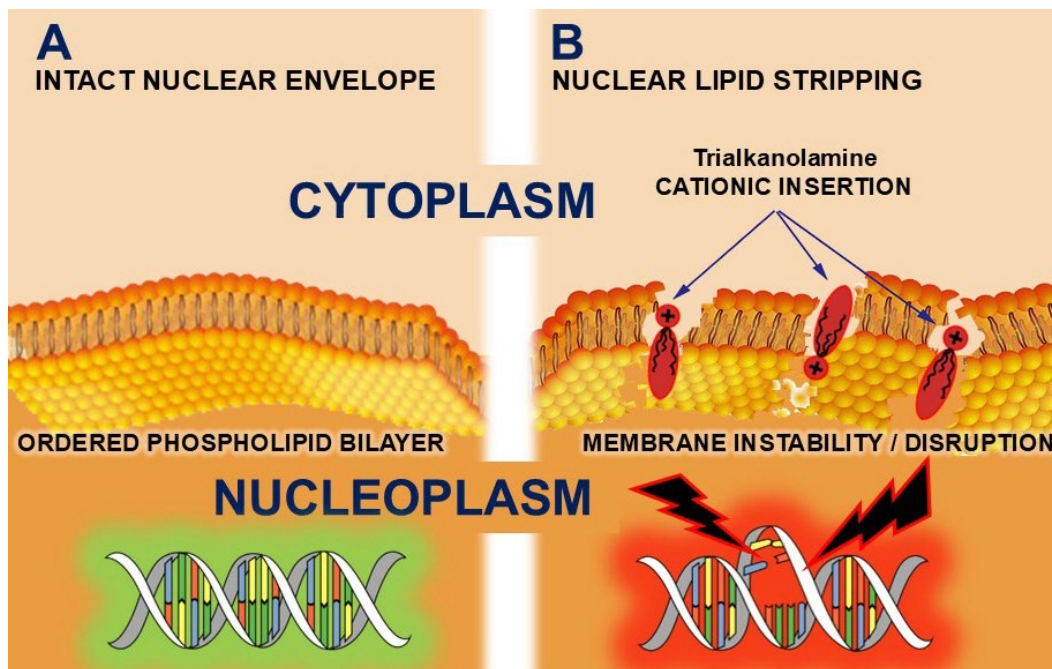


Figura 11. A) Doppio strato fosfolipidico ordinato della membrana nucleare integra. B) Il comportamento detergente della trialcanolamina destabilizza l’involucro nucleare (“lipid stripping”), consentendo l’infiltrazione nucleare e interazioni dirette con il DNA.

Si instaura così un ciclo deleterio: la trialcanolamina compromette la stabilità strutturale del nucleo, mentre l’acido 2-esildecanoico ostacola la riparazione del danno biochimico. Interazioni persistenti tra trialcanolamina e fosfolipidi possono indurre microlesioni della membrana nucleare, facilitando l’ingresso di enzimi citoplasmatici o la fuoriuscita di materiale genetico. Tali fenomeni sono intrinsecamente associati alla senescenza cellulare e alla trasformazione neoplastica — rilievi che si pongono in diretto contrasto con i dossier regolatori in merito alla presunta “inerzia” degli eccipienti lipidici:

“Non sono stati eseguiti studi di genotossicità o di cancerogenicità. Non si prevede che i componenti della formulazione

vaccinale, costituiti da lipidi e RNA, abbiano potenziale genotossico.” (EMA/707383, 2021).

L’omissione dello standard analitico della trialcanolammina nelle valutazioni spettrometriche di massa (Rapporto 043725, 2020) ha precluso la determinazione sperimentale dei suoi valori di logP e pKa. In assenza di dati verificabili, Pfizer ha avanzato affermazioni di “clearance” fondate su standard trascurati o omessi, o persino su dati fabbricati, come nel caso del “fantomatico acido 6-esildecanoico”. Tale impostazione offusca l’effettivo destino catabolico di ALC-0315 e contravviene ai principi fondamentali di trasparenza e rigore scientifico. Dopo essersi liberato della LNP disassemblata dagli endosomi, ALC-0315 va incontro a biotrasformazione in un acido organico capace di inibire la β -ossidazione e in un’ammina terziaria cationica dotata di aggressive proprietà detergenti. Quest’ultima si distingue per elevata mobilità (basso logD), citotossicità (essendo quasi interamente protonata a pH 7,2) e potenti interazioni con i fosfolipidi di membrana, in modo analogo a quanto avviene per i tensioattivi cationici forti. L’accumulo intracellulare di cataboliti recalcitranti favorisce uno stato di infiammazione cronica. Insieme alla destabilizzazione della membrana nucleare, alla generazione di specie reattive dell’ossigeno (ROS) e al deficit di ATP, tale ambiente promuove l’instabilità genomica — ossia la suscettibilità del materiale genetico ad alterazioni strutturali e funzionali. Questa condizione costituisce un precursore primario dello sviluppo oncogeno e della trasformazione neoplastica. Nel caso dei metaboliti di ALC-0315, il rischio è amplificato sia dal danno strutturale di membrana indotto dalle proprietà detergenti del catabolita aminico, sia dalla crisi bioenergetica innescata dal blocco metabolico esercitato dal catabolita acido. Nonostante tali rischi, Pfizer ha omesso di condurre indagini complete sull’instabilità genomica indotta dall’idrolisi di ALC-0315, malgrado i chiari indicatori di citotossicità associati all’elevato pKa intrinseco di tale lipide cationico ionizzabile, che ne accresce la capacità di perturbare e destabilizzare le architetture cellulari (Yun et al. 2016; Yu et al. 2020; Patel et al. 2021; Ndeupen et al. 2021; Palmer et al. 2022; Segalla, 2023a; Segalla, 2023b).

3.4. IL FALLIMENTO DELLA GLUCURONIDAZIONE: UNA LACUNA REGOLATORIA NELLE EVIDENZE DI CLEARANCE METABOLICA

Nel Rapporto Pfizer 043725 (2020), l’ultimo metabolita preso in esame — ancora una volta in assenza di uno standard di riferimento spettrometrico previamente caratterizzato — è l’ammina-glucuronide (m/z 466; t_R 7,9 min). Questa specie è descritta come un coniugato recante una singola unità di acido glucuronico, asseritamente formata su un solo gruppo ossidrilico. L’acido glucuronico costituisce il substrato canonico della superfamiglia delle *UDP-glucuronosyltransferase* (UGT), un sistema centrale di detossificazione di Fase II (Mohsin et al., 2024), espresso prevalentemente nel fegato — e, in misura minore, nell’intestino e nel rene — la cui funzione catalitica consiste nell’aumentare la solubilità acquosa e nel promuovere l’eliminazione renale o biliare di composti endogeni (ad es. bilirubina, ormoni) e xenobiotici (farmaci, tossine; Rowland et al., 2013). Tuttavia, come dettagliato sopra, si prevede che la trialcanolammina generata dall’idrolisi di ALC-0315 vada incontro a un massivo sequestro cationico nei lisosomi. Questo punto è decisivo, poiché gli enzimi UGT sono localizzati prevalentemente nel lume del reticolo endoplasmatico (ER). Una specie protonata (BH^+) fisicamente intrappolata in un compartimento lisosomiale acido presenta una disponibilità citosolica fortemente ridotta e, di conseguenza, un accesso limitato alle UGT residenti nell’ER. La rilevazione riportata di mono-glucuronidi implica pertanto che la glucuronidazione — ove effettivamente avvenga — possa coinvolgere soltanto l’infinitesimale frazione di base libera (0,4%–1,25%) che sfugge transitoriamente all’intrappolamento lisosomiale, trasformando di fatto la “clearance” in un processo stocastico

piuttosto che in una via di eliminazione strutturata ed efficiente.

In altri termini, il dossier depono per una glucuronidazione altamente parziale — se non praticamente trascurabile — limitata a un singolo gruppo ossidrilico tra i tre disponibili sullo scaffold della trialcanolammina. Questa razionale meccanicistica è coerente con la compartimentalizzazione cellulare: con $\approx 99,6\%$ della trialcanolammina protonata e trattenuta nei lisosomi, il substrato risulta di fatto segregato rispetto alle UGT localizzate nel reticolo endoplasmatico (ER), rendendo la coniugazione intrinsecamente inefficiente. Tuttavia, anche questa affermazione limitata rimane analiticamente fragile, poiché l'assenza di standard certificati sia per la trialcanolammina progenitrice sia per la trialcanolammina monoglucuronidata non costituisce una omissione marginale: rappresenta una lacuna *inammissibile* per un dataset UHPLC-MS/MS destinato a finalità regolatorie.

Il fatto che Pfizer riporti soltanto livelli in tracce di monoglucuronide nelle urine di ratto risulta, in questo contesto, più coerente con un “rumore di fondo” generato dalla minima frazione non protonata *prima* del sequestro che con una via significativa di biotrasformazione. La maggior parte della trialcanolammina rimane confinata nel milieu acido lisosomiale, dove la forma BH^+ non costituisce un substrato idoneo per gli enzimi microsomiali. Inoltre, il basso $\log D$ (≈ 0) denota una specie intrinsecamente idrodispersibile, con affinità limitata per le UGT, che in genere processano substrati più lipofili. Considerati congiuntamente alla completa assenza di derivati poliglucuronidati nel Rapporto Pfizer 043725 (2020), questi elementi indicano che la via metabolica di Fase II risulta, in pratica, biochimicamente preclusa; il monoglucuronide identificato è meglio interpretabile come un artefatto metabolico quantitativamente irrilevante.

È particolarmente rilevante — e, sotto il profilo regolatorio, difficilmente giustificabile — che, in assenza di standard analitici certificati per la trialcanolammina e per il suo glucuronide, Pfizer non fosse in grado di determinare con rigore la quantità di composto progenitore non metabolizzato. Presentare il monoglucuronide a $m/\approx 466$ come prova di “clearance metabolica” non è pertanto semplicemente privo di adeguato fondamento scientifico; costituisce una grave irregolarità sotto il profilo probatorio. In mancanza di standard, è impossibile verificare se tale via di eliminazione rappresenti una frazione marginale (potenzialmente $<0,1\%$ della dose somministrata), lasciando aperta — in modo inaccettabile, per un dossier a supporto dell'esposizione umana — la prospettiva di un sostanziale bioaccumulo.

In assenza di una rigorosa quantificazione del bilancio di massa, la mera rilevazione qualitativa di tracce di glucuronide nelle urine di ratto rischia di fungere da surrogato retorico dell'eliminazione, mentre il quesito tossicologico fondamentale rimane irrisolto: se, e in quale misura, la dose somministrata persista nei tessuti. Se l'eliminazione catabolica è davvero tanto marginale quanto suggeriscono i vincoli sopra descritti, il presupposto farmacocinetico si sposta dalla clearance alla ritenzione, con conseguenze prevedibili — citotossicità intrinseca e destabilizzazione di membrana — anziché una pronta rimozione. Un simile impianto probatorio è incompatibile con la trasparenza attesa in farmacologia regolatoria e solleva serie preoccupazioni circa le passività tossicologiche a lungo termine e la permissività del percorso valutativo che ha recepito tali dati (Segalla, 2023a; 2023b).

4. SABOTAGGIO RIBOSOMIALE E FRAMESHIFTING: POTENZIALI CONSEGUENZE ONCOLOGICHE E CARDIOLOGICHE

Sotto stress ossidativo indotto dalle ROS, la degradazione incompleta di ALC-0315 e dei suoi metaboliti a valle può culminare nella perossidazione lipidica e nella generazione di aldeidi reattive, in

particolare 4-idrossinonenale (4-HNE) e malondialdeide (MDA). Queste specie non costituiscono meri biomarcatori, bensì effettori reattivi capaci di formare addotti covalenti con le proteine e con l'mRNA vaccinale, alterando così struttura e funzione delle macromolecole e amplificando la patologia da stress ossidativo (Dalleau et al., 2013; Shoeb et al., 2014; Barrera et al., 2018; Palmer e Bhakdi, 2021; Palmer et al., 2022; Li et al., 2022; Birdsall et al., 2024; Ioannidis et al., 2025).

Questo quadro di danno molecolare fornisce un plausibile innesco per il *ribosomal stalling*, ossia l'immobilizzazione dei ribosomi in traduzione, con una conseguente propensione al *frameshifting* (spostamento della cornice di lettura durante la traduzione; Willi et al., 2018; Shcherbik e Pestov, 2019). Lo stalling non costituisce un'interruzione neutra: attiva vie di stress proteotossico e consuma risorse già limitate dal "vampirismo bioenergetico" indotto da ALC-0315. Sul piano meccanicistico, il ribosoma rimane bloccato sullo stampo di mRNA, ostacolando la fisiologica sintesi proteica e favorendo esiti traduttivi aberranti, inclusi prodotti Spike troncati e — ancor più criticamente — peptidi chimerici privi di omologia con la sequenza wild-type prevista. L'accumulo di proteine troncate e mal ripiegate può eccedere la capacità degradativa cellulare, producendo "detriti proteici" che perturbano la proteostasi e sostengono una segnalazione cronica da stress. Parallelamente, la deplezione di NAD⁺ — cofattore necessario per enzimi di riparazione del DNA quali la poli(ADP-ribosio) polimerasi (PARP) — indebolisce il mantenimento genomico, instaurando così un contesto biochimico permissivo all'instabilità genomica e alla trasformazione neoplastica (Rajman et al., 2018; Xie et al., 2020).

In questo quadro, la cellula può diventare incapace di sostenere una produzione proteica funzionale e di preservare la stabilità genomica, erodendo così i checkpoint regolatori che normalmente contengono la proliferazione incontrollata. Il conseguente squilibrio indirizza plausibilmente il sistema verso due traiettorie patologiche non mutualmente esclusive: (i) una segnalazione proliferativa aberrante che favorisce l'oncogenesi e/o (ii) un fenotipo senescente sostenuto da una cronica segnalazione infiammatoria. La letteratura recente ha associato tali condizioni a manifestazioni oncologiche aggressive riportate dopo la somministrazione della preparazione vaccinale (Goldman et al., 2021; Parry et al., 2023; Abue et al., 2025; Marik and Hope, 2025; Kuperwasser and Wafik, 2026; Gentilini et al., 2026).

I vaccini a mRNA sono stati inoltre associati a sequele infiammatorie cardiache, in particolare miocardite e pericardite, con un'incidenza relativamente più elevata nelle coorti più giovani. Sebbene l'evoluzione clinica sia riportata come favorevole nella maggior parte dei casi, sono stati documentati esiti gravi e, in rare circostanze, fatali (Jablonowski and Hooker, 2022; Oster et al., 2022; Santiago and Oller, 2023; Yu et al., 2023; Yasmin et al., 2023; Yonker et al., 2023; Mead et al., 2024a; Mead et al., 2024b; Hulscher et al., 2024). Un collegamento meccanicistico con il ribosomal frameshifting è biologicamente plausibile, poiché il cuore è costituito in larga parte da cardiomiociti post-mitotici con limitata capacità rigenerativa; di conseguenza, anche episodi transitori di sintesi proteica aberrante e di danno immunomediato possono tradursi in un impatto funzionale sproporzionato. In questo contesto, il frameshifting non dovrebbe essere considerato semplicemente un'irregolarità traduzionale, bensì un plausibile contributore a monte dell'immunopatologia cardiaca: generando nuove sequenze peptidiche, esso può creare neoantigeni capaci di suscitare un riconoscimento immunitario mirato all'interno di un tessuto in gran parte post-mitotico e con limitata capacità di sostituire le cellule danneggiate.

Le nanoparticelle lipidiche (LNP), la cui stabilità sistemica è accresciuta da un basso *pKa* apparente,

possono persistere in circolo per un tempo sufficiente a raggiungere i cardiomiociti attraverso il torrente ematico. Dopo l'ingresso cellulare, le LNP rilasciano il carico di mRNA, che viene quindi tradotto dai ribosomi dell'ospite nel citoplasma del cardiomiocita. Se in questo contesto si verifica *frameshifting*, la traduzione può generare proteine aberranti e chimeriche che divergono dalla sequenza primaria prevista. Poiché tali prodotti sono estranei alla biologia dell'ospite, essi possono essere processati e riconosciuti come non-self attraverso consolidati meccanismi immunologici, tra cui:

- *Generazione di proteine estranee*: i prodotti derivati dal *frameshifting* possono presentare sequenze amminoacidiche anomale che si discostano dalle proteine fisiologiche dell'ospite, aumentandone l'immunogenicità e facilitandone il riconoscimento come potenzialmente patogene.
- *Presentazione tramite MHC-I*: dopo la sintesi, i cardiomiociti possono esporre sulla superficie cellulare peptidi derivati da proteine aberranti mediante il Complesso Maggiore di Istocompatibilità di Classe I (MHC-I), consentendo la sorveglianza immunitaria di prodotti traduzionali intracellulari alterati.
- *Coinvolgimento dei linfociti T citotossici CD8⁺*: i linfociti T CD8⁺ possono interpretare questi neoantigeni presentati come indicatori di infezione, alterazione genetica o trasformazione neoplastica e avviare l'eliminazione citotossica dei cardiomiociti. Questa cascata immunitaria può culminare in una miocardite acuta con potenziale compromissione della funzione d'organo.

Inoltre, le proteine chimeriche o troncate derivate dal *frameshifting* possono esporre epitopi di superficie — brevi motivi amminoacidici — che, per casualità o per parziale omologia strutturale, somigliano a epitopi presenti in proteine endogene umane. Tale mimetismo molecolare può offuscare il confine tra self e non-self, aumentando la probabilità di un cross-targeting immunitario e ampliando così il danno dai prodotti “estranei” ai tessuti cardiaci nativi, attraverso meccanismi quali:

- *Cross-reattività*: se una proteina chimerica derivata da *frameshifting* presenta una sufficiente similarità con la α -miosina cardiaca o con proteine strutturali desmosomiali essenziali per la coesione dei cardiomiociti, anticorpi e linfociti T pre-attivati contro la “pseudo-Spike” possono reagire in modo crociato con i bersagli nativi, innescando un danno miocardico autoimmune.
- *Infiammazione pericardica*: in modo analogo, un mimetismo che coinvolge proteine espresse dal mesotelio pericardico può ridurre la soglia di attivazione del targeting immunitario verso i tessuti pericardici, facilitando la pericardite come conseguenza a valle di una risposta immunitaria aberrante.

Come documentato in numerosi studi, le nanoparticelle lipidiche (LNP) non dovrebbero essere considerate vettori inerti, bensì piattaforme dotate di una potente attività adiuvante pro-infiammatoria (Zaman et al., 2013; Swaminathan et al., 2016a, 2016b; Tizard, 2020; Sahin et al., 2020; Verbeke et al., 2022; Ndeupen, 2021; Alameh et al., 2021; Tahtinen et al., 2022). In un milieu cellulare già orientato verso l'infiammazione dai residui di ALC-0315 e dai cataboliti tossici, la concomitante presenza di prodotti traduzionali aberranti generati tramite *frameshifting* può abbassare ulteriormente le soglie di tolleranza immunologica e intensificare la segnalazione infiammatoria a livello tissutale.

L'inflammasoma NLRP3 è un complesso multiproteico citoplasmatico del sistema immunitario innato che rileva lo stress cellulare e i segnali di pericolo (Kelley et al., 2019). Nel tessuto cardiaco, l'esposizione combinata ai segnali infiammatori indotti dalle LNP e ai prodotti proteici chimerici può

promuovere un'iperattivazione di NLRP3 nei macrofagi cardiaci residenti, con conseguente aumentato rilascio di interleuchine pro-infiammatorie, in particolare IL-1 β e IL-18, meccanicisticamente implicate nella miocardite.

Nel complesso, la convergenza di (i) attività adiuvante delle LNP, (ii) comparsa di prodotti traduzionali aberranti e (iii) disregolazione immunitaria delinea una via coerente verso risposte infiammatorie intense e potenzialmente deleterie nel tessuto cardiaco. A tale riguardo, è degno di nota che l'aumentata efficienza traduzionale dell'mRNA vaccinale — resa possibile dalla sostituzione dell'uridina con N1-metil-pseudouridina — sia stata ipotizzata come fattore capace di incrementare la probabilità di *ribosomal frameshifting* (Federico, 2024; Mulroney et al., 2024; Rubio-Casillas et al., 2024). Se ciò fosse confermato, il conseguente spettro di prodotti proteici indesiderati e immunogenici amplierebbe la gamma dei plausibili effetti biologici intrinseci alla piattaforma mRNA/LNP.

5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

L'autorizzazione all'immissione in commercio subordinata a condizioni (CMA) concessa al prodotto Pfizer/BioNTech sembra poggiare su una rappresentazione materialmente inaccurata del destino metabolico del lipide ionizzabile ALC-0315. In particolare, la narrazione regolatoria — per come può essere ricostruita dai dossier presentati — si fonda sulla citazione di entità chimiche non dimostrabilmente tracciabili, in luogo degli autentici cataboliti che ci si attenderebbe sulla base di elementari considerazioni chimiche. Una simile sostituzione non costituisce una marginale tecnicità: essa potrebbe viziare il fondamento probatorio della valutazione e, per estensione, compromettere l'integrità della valutazione beneficio/rischio su larga scala. In questo contesto, meritano attenzione le osservazioni attribuite a Helmut Sterz, già Chief Toxicologist di Pfizer: egli avrebbe ritenuto il pacchetto preclinico promosso da Pfizer/BioNTech insufficiente a garantire in modo robusto la sicurezza dei partecipanti alla sperimentazione e, successivamente, della popolazione generale. In *Die Impf-Mafia [The Vaccination Mafia, 2026]*, egli sostiene inoltre che le condizioni di emergenza non fanno venir meno i doveri istituzionali; le autorità competenti mantengono l'obbligo di esigere evidenze di sicurezza rigorose nell'ambito delle proprie competenze di farmacovigilanza. Si tratta di un richiamo scomodo ma inevitabile: quando l'asticella probatoria viene abbassata, la responsabilità non può essere trasferita unicamente sui produttori. Un confronto strutturato tra il Rapporto Pfizer 043725 (*Materials*, p. 4), il *Nonclinical Evaluation Report* della TGA australiana (2021; Pharmacokinetics — Novel Excipients, p. 11) e l'*Assessment Report* EMA su *Comirnaty* (19 febbraio 2021; Sezione 2.3.2, p. 48) mette in evidenza incongruenze interne nel modo in cui le evidenze tossicologiche e metaboliche sono state rappresentate e poi trasferite nelle conclusioni regolatorie, in assenza di un esame sufficientemente critico e confutatorio. Sulla base della ricostruzione meccanicistica sviluppata nel presente lavoro, ALC-0315 dovrebbe essere considerato non semplicemente un eccipiente funzionale delle LNP, bensì un precursore bioattivo capace di interferire con sistemi cellulari fondamentali attraverso almeno tre vie convergenti:

- Inibizione della β -ossidazione mitocondriale, mediata dall'*acido 2-esildecanoico* (H410; *Aquatic Chronic 1*).
- Disruzione dell'omeostasi lisosomiale e sequestro lisosomotropico, determinati dalla trialcanolammina cationica *[(4-hydroxybutyl)azanediy]dibexanol*.

- Destabilizzazione dell'involucro nucleare ("lipid stripping") attraverso una perturbazione di membrana di tipo detergente.

Nel complesso, il profilo di sicurezza di ALC-0315, quale emerge dalla documentazione esaminata, viene qui posto in discussione su tre piani strettamente interconnessi: (i) l'impiego di standard analitici insufficientemente documentati, (ii) l'omissione — sia metodologica sia interpretativa — di caratteristiche tossicologiche critiche dei cataboliti di derivazione amminica e (iii) le conseguenze biologiche a valle discusse sopra, incluso il sabotaggio ribosomiale. Il presunto impiego di uno standard "6-esildecanoico" emerge come una criticità centrale — e difficilmente giustificabile — poiché indirizza la valutazione verso un isomero teorico e prontamente degradabile anziché verso l'autentico metabolita, l'*acido 2-esildecanoico*, che reca una classificazione H410 (*molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata*). In termini regolatori, H410 fa scattare l'obbligo di considerare persistenza e bioaccumulo anche a bassi livelli di esposizione; eppure, non risulta che il corrispondente profilo di rischio cronico sia stato adeguatamente esplorato, né dal titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio né dalle autorità valutatrici. Nel Rapporto 043725, Pfizer afferma che i metodi LC-MS/MS sarebbero stati validati utilizzando l'"acido 6-esildecanoico" quale standard di riferimento. Tuttavia, si riferisce che tale entità sarebbe priva di un numero CAS tracciabile, assente dalle principali banche dati di riferimento (ad es. PubChem, NIST) e non disponibile nei cataloghi commerciali (ad es. Millipore Sigma). Se così fosse, la pretesa di validazione non sarebbe semplicemente debole; diverrebbe probatoriamente non verificabile. Di conseguenza, la robustezza delle determinazioni di clearance — inclusi linearità e limiti di quantificazione (LOQ) — risulta posta in dubbio, con l'ulteriore implicazione che il dataset potrebbe non soddisfare i requisiti delle Good Laboratory Practice (GLP), fino a configurare una possibile falsa rappresentazione materiale in ambito regolatorio.

La ricostruzione qui presentata si fonda inoltre sul rapporto della TGA australiana, che identifica esplicitamente l'*acido 2-esildecanoico* quale metabolita rilevante, quale controcarta documentale idoneo a suggerire che l'autentico catabolita fosse noto e caratterizzabile. In questa prospettiva, la comparsa di un isomero differente nei dossier regolatori primari relativi a un medicinale iniettabile destinato a milioni di soggetti viene interpretata come funzionalmente compatibile con una strategia diretta ad attenuare o perfino occultare l'onere tossicologico percepito associato alla classificazione H410 — un esito che, in ambito regolatorio, è difficile considerare diversamente da un vulnus alla compliance e al dovere fondamentale di tutela della salute pubblica. Si sostiene inoltre che indagini essenziali sulla tossicità cronica e sul bioaccumulo — precisamente quelle implicate da un composto persistente classificato H410 — non siano state eseguite oppure, quantomeno, non risultino documentate in modo trasparente nel materiale esaminato. Una sostanza descritta come persistente in contesti ambientali e biologici richiederebbe, secondo la normale prassi regolatoria, un pacchetto probatorio rafforzato; il percorso del dossier sembra invece essere stato ammortizzato mediante il ricorso a un acido grasso non studiato che, oltre a essere presentato come materiale di riferimento dal fondamento scientifico incerto, è anche incoerente con la chimica attesa dell'idrolisi della molecola progenitrice. Un simile approccio è radicalmente incompatibile con gli obblighi di trasparenza e con la finalità dichiarata di tutela della salute pubblica. Se il metabolita autentico è il composto 2-esil, mentre la documentazione è invece ancorata a un costrutto 6-esil (privo di classificazione H410 e presentato come teoricamente più degradabile), allora le autorità valutatrici potrebbero essere state poste nella condizione di esaminare un profilo di rischio cronico incompleto o distorto. In tale prospettiva, i meccanismi discussi nel presente lavoro — inibizione mitocondriale e destabilizzazione dell'involucro nucleare — si traducono in passività a lungo termine non dichiarate e insufficientemente testate per le popolazioni esposte.

L'adozione acritica dell'“acido 6-esildecanoico” quale metabolita primario nell'Assessment Report dell'EMA (2021, p. 48) suggerisce inoltre che i controlli di tracciabilità nei repertori chimici internazionali non siano stati applicati con la diligenza attesa nel quadro di controllo di qualità del CHMP (*Committee for Medicinal Products for Human Use*).

In conclusione, sulla base degli elementi probatori e meccanicistici sopra esposti, si propone la revoca cautelativa dell'autorizzazione all'immissione in commercio subordinata a condizioni (CMA) per Comirnaty quale misura proporzionata volta a ristabilire l'integrità regolatoria e a interrompere immediatamente ogni esposizione evitabile della salute pubblica, mentre le criticità tossicologiche ancora pendenti siano affrontate sotto piena tracciabilità analitica.

I presupposti a sostegno di tale richiesta possono essere così riassunti:

1. *Compromissione del consenso regolatorio*: l'EMA, come emerge dall'Assessment Report del 19 febbraio 2021, sembra essere stata influenzata dall'inclusione e dal successivo avallo di isomeri chimici non tracciabili (e potenzialmente inesistenti), con conseguente compromissione del processo valutativo e plausibile sottostima del rischio.
2. *Rischio per la salute pubblica*: la persistenza intracellulare e l'impatto bioenergetico dei cataboliti (*acido 2-esildecanoico* e *trialcanolammina [(4-hydroxybutyl)azanediy]dibexanol*) comportano rischi non dichiarati di tossicità sistemica e di instabilità genomica per i soggetti esposti.
3. *Protocolli di sicurezza e Principio di Precauzione*: l'impiego di nanomateriali lipidici il cui profilo tossicologico risulta caratterizzato in modo inadeguato è incompatibile con il Principio di Precauzione e con le aspettative regolatorie europee relative ai medicinali contenenti nanomateriali, con conseguente compromissione della sicurezza dei destinatari.
4. *Profilo etico*: le criticità documentate sollevano una manifesta preoccupazione rispetto agli standard fondamentali della sperimentazione umana, inclusi quelli recepiti dall'Articolo 10 del Codice di Norimberga: “*Nel corso dell'esperimento, lo scienziato responsabile deve essere pronto a interrompere l'esperimento in qualsiasi fase qualora abbia motivo probabile di ritenere, nell'esercizio della buona fede, della competenza superiore e del giudizio prudente richiesti, che la prosecuzione dell'esperimento possa verosimilmente determinare lesioni, disabilità o morte del soggetto sperimentale.*”

Finanziamenti e conflitti di interesse

L'autore dichiara di non aver ricevuto alcun finanziamento volto a influenzare quanto qui esposto e che la ricerca è stata condotta in assenza di qualsiasi rapporto commerciale o finanziario che possa essere interpretato come un potenziale conflitto di interessi.

Ringraziamenti

L'autore rivolge un ringraziamento ai revisori paritari di questo articolo, che ne hanno unanimemente raccomandato la pubblicazione. In conformità alla policy della rivista, l'Editor-in-Chief lo ha informato che il contributo è stato accettato per la pubblicazione senza condizioni, sulla base delle revisioni di Stephanie Seneff, PhD, Robert M. Davidson, MD, PhD, Christopher A. Shaw, PhD e Daniel Santiago, PharmD. Fatti salvi i materiali citati tratti da Pfizer e da altre fonti, l'autore si assume la responsabilità di quanto qui pubblicato.

Riferimenti

- Abue, M., Mochizuki, M., Shibuya-Takahashi, R., Ota, K., Wakui, Y., Iwai, W., Kusaka, J., Saito, M., Suzuki, S., Sato, I., et al. (2006). Repeated COVID-19 Vaccination as a Poor Prognostic Factor in Pancreatic Cancer: A Retrospective, Single Center Cohort Study. *Cancers* 2025, 17, 2006. <https://doi.org/10.3390/cancers17122006>
- Alameh, M. G., Tombácz, I., Bettini, E., Lederer, K., Ndeupen, S., Sittplangkoon, C., Wilmore, J.R., Gaudette, B.T., Soliman, O.Y., Pine, M., Hicks, P., Manzoni, T.B., Knox, J.J., Johnson, J.L., Laczko, D., Muramatsu, H., Davis, B., Meng, W., Rosenfeld, A.M., Strohmeier, S., Lin, P., J.C., Mui, L.B., Tam, Y.K., Karikó, K., Jacquet, A., Krammer, F., Bates, P., Cancro, M.P., Weissman, D., Prak, E.T.L., Allman, D., Igyártó, B.Z., Locci, M., Pardi, N. (2021). *Immunity* 54(12), 2877–2892 ©2021 Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.11.001>
- Anderson, N., Borlak, J. (2006). Drug-induced phospholipidosis. *FEBS Letters*, Volume 580, Issue 23, 2006, pages 5533-5540, ISSN 0014-5793. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.061>
- Australian Government Department of Health. Therapeutic Goods Administration (TGA). Health Safety Regulation. Document 6. (2021). Nonclinical Evaluation Report - BNT162b2 [mRNA] COVID-19 vaccine (COMIRNATY™). Submission No: PM-2020-05461-1-2. Sponsor: Pfizer Australia Pty Ltd. January 2021. <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/foi-2389-06.pdf>
- Barrera, G., Pizzimenti, S., Daga, M., Dianzani, C., Arcaro, A., Cetrangolo, GP., Giordano, G., Cucci, MA., Graf, M., Gentile, F. (2018). Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes, 4-Hydroxynonenal and Malondialdehyde in Aging-Related Disorders. *Antioxidants* (Basel). 2018 Jul 30;7(8):102. doi: 10.3390/antiox7080102. PMID: 30061536; PMCID: PMC6115986. <https://doi.org/10.3390/antiox7080102>
- Birdsall, R. E., Han, D., DeLaney, K., Kowalczyk, A., Cojocar, R., Lauber, M., Le Huray, J. (2024). Monitoring stability indicating impurities and aldehyde content in lipid nanoparticle raw material and formulated drugs. *Journal of Chromatography B*.1570-0232/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2024.124005>
- Boldyrev, I.A., Shendrikov, V.P., Vostrova, A.G. et al. (2023). A Route to Synthesize Ionizable Lipid ALC-0315, a Key Component of the mRNA Vaccine Lipid Matrix. *Russ J Bioorg Chem* 49, 412–415 (2023). <https://doi.org/10.1134/S1068162023020061>
- Cheng, T., Zhao, Y., Li, X., Lin, F., Xu, Y., Zhang, X., Li, Y., Wang, R., Lai, L. Computation of octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge. *J Chem Inf Model*. 2007 Nov-Dec;47(6):2140-8. Epub 2007 Nov 7. PMID: 17985865. <https://doi.org/10.1021/ci700257y>
- Dalleau, S., Baradat, M., Guéraud, F., Huc, L. (2013). Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ*. 2013 Dec;20(12):1615-30. Epub 2013 Oct 4. PMID: 24096871; PMCID: PMC3824598. <https://www.nature.com/articles/cdd2013138>
- European Medicines Agency (EMA). (2020). Rapporteur Rolling Review critical assessment report Quality aspects COVID-19 mRNA Vaccine BioNTech. Applicant: BioNTech Manufacturing GmbH. 2020-11-19. <https://factreview.s3.eu-central-1.amazonaws.com/uploads/2023/07/Rolling-Review-Report-Quality-COVID-19-mRNA-Vaccine-BioNTech.pdf>
- European Medicines Agency (EMA). (2021). Assessment report Comirnaty. Common name: COVID-19 mRNA vaccine (nucleoside-modified). Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000. 19 February 2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf
- European Parliament and Council of the European Union (2001). Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001L0083>
- European Parliament and Council of the European Union (2004). Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament

- and of the Council of 31 March 2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004R0726>
- European Parliament and Council of the European Union (2008). Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R1272>
- Federico, M. (2024). The Immunologic Downsides Associated with the Powerful Translation of Current COVID-19 Vaccine mRNA Can Be Overcome by Mucosal Vaccines. *Vaccines*, 12(11), 1281. <https://doi.org/10.3390/vaccines12111281>
- Fromenty, B., Pessayre, D. (1995). Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther.* 1995;67(1):101-54. doi: 10.1016/0163-7258(95)00012-6. PMID: 7494860. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)00012-6](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)00012-6)
- Gentilini, P., Lindsay, J.C., Konishi, N., Fukushima, M., Polykretis, P. (2026). Exploring the potential link between mRNA COVID-19 vaccinations and cancer: A case report with a review of haematopoietic malignancies with insights into pathogenic mechanisms. *Oncotarget*. 2026; 17:34-49. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.28827>
- Goldman, S., Bron, D., Tousseyn, T., Vierasu, I., Dewispelaere, L., Heimann, P., Cogan, E., Goldman, M. (2021) Rapid Progression of Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma Following BNT162b2 mRNA Vaccine Booster Shot: A Case Report. *Front. Med.* 8:798095. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.798095>
- Hassett, K., J., Benenato, K.E., Jacquinet, E., Lee, A., Woods, A., Yuzhakov, O., Himansu, S., Deterling, J., Geilich, B.M., Ketova, T., Mihai, C., Lynn, A., McFadyen, I., Moore, M.J., Senn, J.J., Stanton, M.G., Almarsson, Ö., Ciaramella, G., Brito, L.A. (2019). Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. *Molecular Therapy: Nucleic Acids* Vol. 15, 1-11 <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.01.013>
- Hilal, S.H., Karickhoff, S.W., Carreira, L.A. (2003). Prediction of chemical reactivity parameters and physical properties of organic compounds from molecular structure using SPARC. National Exposure Research Laboratory. Office of Research and Development. U.S. Environmental Protection Agency. March 2003. EPA/600/R-03/030. https://archive.epa.gov/athens/archive-athens/web/pdf/epa_600_r03_030.pdf
- Hou, X., Zaks, T., Langer, R., Dong, Y. (2021). Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater* 6, 1078–1094. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>
- Hulscher, N., Hodkinson, R., Makis, W., McCullough, P. (2024). Autopsy findings in cases of fatal COVID-19 vaccine-induced myocarditis. *ESC Heart Fail.* 2025 Oct;12(5):3212-3225. doi: 10.1002/ehf2.14680. Epub 2024 Jan 14. PMID: 38221509; PMCID: PMC12450757. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38221509/>
- Jablonowski, K., Hooker, B. S. (2022). Delayed Vigilance: A Comment on Myocarditis in Association with the COVID-19 Injections. (2022). *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research*, 2(2), 651.1-651.4. <https://doi.org/10.56098/ijvtpr.v2i2.61>
- Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., He, Y. (2019). The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 6;20(13):3328. doi: 10.3390/ijms20133328. PMID: 31284572; PMCID: PMC6651423. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>
- Khan, H. (2024). UHPLC-MS/MS Technique: Applications in Analytical Chemistry. *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 36, No. 4 (2024), 766-778. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2024.31383>
- Kuperwasser, C., El-Deiry, WS. (2026). COVID vaccination and post-infection cancer signals: Evaluating patterns and potential biological mechanisms. *Oncotarget*. 2026. 17:1–29. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.28824> .[PubMed]

- Ioannidis, M., Tjepkema, J., Uitbeijerse, M. R.P., van den Bogaart, G. (2025). Immunomodulatory effects of 4-hydroxynonenal. *Redox Biology*, Volume 85, September 2025, 103719, ISSN 2213-2317. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2025.103719>
- Li, Y., Zhao, T., Li, J., Xia, M., Li, Y., Wang, X., Liu, C., Zheng, T., Chen, R., Kan, D., Xie, Y., Song, J., Feng, Y., Yu, T., Sun, P. (2022). Oxidative Stress and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE): Implications in the Pathogenesis and Treatment of Aging-related Diseases. *J Immunol Res.* 2022 Mar 23;2022:2233906. <https://doi.org/10.1155/2022/2233906>. PMID: 35411309; PMCID: PMC8994689.
- Marik, P., Hope, J. (2025). COVID-19 mRNA-Induced “Turbo Cancers”. *J Indep Med* 2025 Vol. 1 No. 3. <https://doi.org/10.71189/JIM/2025/V01N03A02>
- Mead, M.N., Seneff, S., Wolfinger, R., Rose, J., Denhaerynck, K., Kirsch, S., McCullough, P. A. (2024). COVID-19 Modified mRNA “Vaccines”: Lessons Learned from Clinical Trials, Mass Vaccination, and the Bio-Pharmaceutical Complex, Part 1. (2024). *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research* , 3(2), 1112-1178. <https://doi.org/10.56098/fdrasy50>
- Mead, M.N., Seneff, S., Rose, J., Wolfinger, R., Hulscher, N., McCullough, P. A. (2024). COVID-19 Modified mRNA “Vaccines”: Lessons Learned from Clinical Trials, Mass Vaccination, and the Bio-Pharmaceutical Complex, Part 2. (2024). *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research* , 3(2), 1275-1344. <https://doi.org/10.56098/w66wjg87>
- Mohsin, N.u.A., Farrukh, M., Shahzadi, S., Irfan, M. (2024). Drug Metabolism: Phase I and Phase II Metabolic Pathways. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. IntechOpen. Edited by Mithun Rudrapal. DOI: 10.5772/intechopen.112854. <https://www.intechopen.com/chapters/88053>
- Mulrone, T.E, Pöyry, T., Yam-Puc, J.C., Rust, M., Harvey, R.F., Kalmar, L., Horner, E., Booth, L., Ferreira, A.P., Stoneley, M., Sawarkar, R., Mentzer, A.J., Lilley, K.S., Smales, C.M., von der Haar, T., Turtle, L., Dunachie, S., Klenerman, P., Thaventhiran, J.E.D., Willis, A.E. (2024). N1-methylpseudouridylation of mRNA causes +1 ribosomal frameshifting. *Nature*. 2024 Jan;625(7993):189-194. Epub 2023 Dec 6. PMID: 38057663; PMCID: PMC10764286. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06800-3>
- Ndeupen, S., Qin, Z., Jacobsen, S., Bouteau, A., Estanbouli, H., Igyarto, B.Z. (2021). The mRNA-LNP platform’s lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory. *iScience* 24, 103479. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103479>
- Oster, ME., Shay, DK., Su, JR., Gee, J., Creech, CB., Broder, KR., Edwards, K., Soslow, JH., Dendy, JM., Schlaudecker, E., Lang, SM., Barnett, ED., Ruberg, FL., Smith, MJ., Campbell, MJ., Lopes, RD., Sperling, LS., Baumblatt, JA., Thompson, DL., Marquez, PL., Strid, P., Woo, J., Pugsley, R., Reagan-Steiner, S., DeStefano, F., Shimabukuro, TT. (2022). Myocarditis Cases Reported After mRNA-Based COVID-19 Vaccination in the US From December 2020 to August 2021. *JAMA*. 2022 Jan 25;327(4):331-340. PMID: 35076665; PMCID: PMC8790664. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.24110>
- Palmer, M., Bhakdi, S., Wodarg, W. (2022). Expertise on the genotoxic risks of the Pfizer COVID-19 vaccine. <https://childrenshealthdefense.eu/wp-content/uploads/2022/07/att.-3-genotoxicity-mrna-vaccines-scientific-report.pdf>
- Parry, P.I., Lefringhausen, A., Turni, C., Neil, C.J., Cosford, R., Hudson, N.J., Gillespie, J. (2023). ‘Spikeopathy’: COVID-19 Spike Protein Is Pathogenic, from Both Virus and Vaccine mRNA. *Biomedicines* 2023, 11, 2287. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11082287>
- Patel, P., Ibrahim, N.M., Cheng, K. (2021). The Importance of Apparent pKa in the Development of Nanoparticles Encapsulating siRNA and mRNA. *Trends in Pharmacological Sciences*, 42(6), 448–460. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.03.002>
- Pfizer. (2020). Investigation of the Biotransformation of ALC-0159 and ALC-0315 In vitro and in vivo in rats. PF-07302048

- Biotransformation. PF-07302048_05Aug20_043725.https://phmpt.org/wp-content/uploads/2023/02/125742_S1_M4_4.2.2.4-043725.pdf
- Prakash, S. (2018). Beta (β)-Oxidation of Fatty Acid and its associated Disorders. Vol. 5 (1), pp. 158-172, December, 2018. Global Science Research Journals. International Journal of Clinical Biochemistry. <https://www.globalscienceresearchjournals.org/articles/beta-oxidation-of-fatty-acid-and-its-associated-disorders.pdf>
- Rajman, L., Chwalek, K., Sinclair, D. (2018). Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. Cell Metabolism. Cell Press. ; 27, 529-547. March 06, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.011>
- Rowland, A., Miners, J.O., Mackenzie, P.I. (2013). The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. Int J Biochem Cell Biol. 2013 Jun;45(6):1121-32. doi: 10.1016/j.biocel.2013.02.019. Epub 2013 Mar 7. PMID: 23500526. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1357272513000654?via%3Dihub>
- Rubbens, J., Wille, S., Samyn, N. (2022). Sample preparation and quantitative UHPLC-MS/MS analysis in an accredited high-throughput environment: Tips and tricks to improve your success ratio. Elsevier. Toxicologie Analytique et Clinique. Volume 34, Issue 3, Supplement, September 2022, Page S162. <https://doi.org/10.1016/j.toxac.2022.06.277>
- Rubio-Casillas, A., Cowley, D., Raszek, M., Uversky, VN., Redwan, EM. (2024). Review: N1-methyl-pseudouridine (m¹Ψ): Friend or foe of cancer? Int J Biol Macromol. 2024 May;267(Pt 1):131427. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.131427. Epub 2024 Apr 5. Erratum in: Int J Biol Macromol. 2024 Jun;270(Pt 2):132447.2024.132447. PMID: 38583833. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131427>
- Saadati, F., Cammarone, S., Ciufolini, M. A. (2022). A Route to Lipid ALC-0315: a Key Component of a COVID-19 mRNA Vaccine. Chem. Eur. J.2022, 28, e202200906. <https://doi.org/10.1002/chem.202200906>
- Sanjeev, R., Jagannadham, V., Skelton, A., Sreedhar, P., Bethapudi, V., E., M., Vvath, R., V. (2017). Taft Equation - A Convenient Tool to Decide the Position of Attack in the Reactions of Aliphatic Amines and TI (III). Orient J Chem 2017;33(5). <https://www.orientjchem.org/vol33no5/role-of-taft-equation-in-selecting-the-site-of-attack-in-the-reactions-of-aliphatic-amines-and-tiii/#:~:text=Introduction,steric%20and%20polar%20contributions%20effect>.
- Santiago, D., Oller, J. W. (2023). Abnormal Clots and All-Cause Mortality During the Pandemic Experiment: Five Doses of COVID-19 Vaccine Are Evidently Lethal to Nearly All Medicare Participants . (2023). International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research , 3(1), 847-890. <https://doi.org/10.56098/ijvtp.v3i1.73>
- Schulz, H. (2002). Oxidation of fatty acids in eukaryotes. Elsevier. New Comprehensive Biochemistry. Volume 36, 2002, Pages 127-150. [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(02\)36007-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(02)36007-1)
- Segalla, G. (2023a). Chemical-physical criticality and toxicological potential of lipid nanomaterials contained in a COVID-19 mRNA vaccine. International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research, 3(1), 787–817. <https://doi.org/10.56098/ijvtp.v3i1.68>
- Segalla, G. (2023b). Apparent Cytotoxicity and Intrinsic Cytotoxicity of Lipid Nanomaterials Contained in a COVID-19 mRNA Vaccine. International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research , 3(1), 957-972. <https://doi.org/10.56098/ijvtp.v3i1.84>
- Segalla, G. (2024). Adjuvant Activity and Toxicological Risks of Lipid Nanoparticles Contained in the COVID-19 “mRNA Vaccines”. International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research , 3(2), 1085-1102. <https://doi.org/10.56098/z1yjdjm29>
- Shcherbik, N., Pestov, D.G. (2019). The Impact of Oxidative Stress on Ribosomes: Cells. 2019; 8(11):1379. <https://doi.org/10.3390/cells8111379>
- Shoeb, M., Ansari, NH., Srivastava, SK., Ramana, KV. (2014). 4-Hydroxynonenal in the pathogenesis and progression of human diseases. Curr Med Chem. 2014;21(2):230-7. PMID: 23848536; PMCID: PMC3964795.

<http://dx.doi.org/10.2174/09298673113209990181>

- Sterz, H. (2026). DIE IMPF-MAFIA [The Vaccination Mafia]. ISBN 978-3-907606-00-1 - 5th edition 2026. Rubikon-Verlag GmbH, Basel. Book Review by Prof. Harald Walach: <https://harald-walach.info/2025/11/27/book-review-helmut-sterz-the-vaccination-mafia/>
- Sudbrack, T. P., Archilha, N. L., Itri, R., & Riske, K. A. (2011). Observing the Solubilization of Lipid Bilayers by Detergents with Optical Microscopy of GUVs. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(2), 269–277. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp108653e>
- Swaminathan, G., Thoryk, E.A., Cox, K.S., Meschino, S., Dubey, S.A., Vora, K.A., Celano, R., Gindy, M., Casimiro, D.R., and Bett, A.J. (2016a). A novel lipid nanoparticle adjuvant significantly enhances B cell and T cell responses to sub-unit vaccine antigens. *Vaccine* 34, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.132>
- Swaminathan, G., Thoryk, E.A., Cox, K.S., Smith, J.S., Wolf, J.J., Gindy, M.E., Casimiro, D.R., and Bett, A.J. (2016b). A tetravalent sub-unit dengue vaccine formulated with ionizable cationic lipid nanoparticle induces significant immune responses in rodents and non-human primates. *Sci. Rep.* 6, 34215. <https://doi.org/10.1038/srep34215>
- Tahtinen, S., Tong, A.J., Himmels, P. et al. (2022) IL-1 and IL-1ra are key regulators of the inflammatory response to RNA vaccines. *Nat Immunol* 23, 532–542. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01160-y>
- Tizard, I. R. (2020). Vaccines for Veterinarians. Chapter 7, Adjuvants and adjuvanticity, 75-86, ISBN 978-0-323-68299-2, Elsevier, <https://doi.org/10.1016/C2018-0-01755-7>
- Verbeke, R., Hogan, M. J., Lore, K., Pardi, N. (2022). Innate immune mechanisms of mRNA vaccines. *Cell Press, Review. Immunity* 55, 1993-2005. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.10.014>
- Willi, J., K pfer, P., Ev quoz, D., Fernandez, G., Katz, A., Leumann, C., Polacek, N. (2018). Oxidative stress damages rRNA inside the ribosome and differentially affects the catalytic center. *Nucleic Acids Research*, Volume 46, Issue 4, 28 February 2018, Pages 1945–1957. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1308>
- Xie, N., Zhang, L., Gao, W. et al. NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Sig Transduct Target Ther* 5, 227 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00311-7>
- Yu, CK., Tsao, S., Ng, CW., Chua, GT., Chan, KL., Shi, J., Chan, YY., Ip, P., Kwan, MY., Cheung, YF. (2023). Cardiovascular Assessment up to One Year After COVID-19 Vaccine-Associated Myocarditis. *Circulation*. 2023 Aug;148(5):436-439. Epub 2023 Jul 31. PMID: 37523760; PMCID: PMC10373639. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.123.064772>
- Yonker, LM., Swank, Z., Bartsch, YC., Burns, MD., Kane, A., Boribong, BP., Davis, JP., Loisel, M., Novak, T., Senussi, Y., Cheng, CA., Burgess, E., Edlow, AG., Chou, J., Dionne, A., Balaguru, D., Lahoud-Rahme, M., Arditi, M., Julg, B., Randolph, AG., Alter, G., Fasano, A., Walt, DR. (2023). Circulating Spike Protein Detected in Post-COVID-19 mRNA Vaccine Myocarditis. *Circulation*. 2023 Mar 14;147(11):867-876. Epub 2023 Jan 4. PMID: 36597886; PMCID: PMC10010667. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.122.061025>
- Yu, Z., Li, Q., Wang, J., Yu, Y., Wang, Y., Zhou, Q. (2020). Reactive Oxygen Species- Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field - *Nanoscale Res Lett* 15, 115. <https://doi.org/10.1186/s11671-020-03344-7>
- Yasmin, F., Najeeb, H., Naeem, U., Moeed, A., Atif, A.R., Asghar, M.S., Nimri, N., Saleem, M., Bandyopadhyay, D., Krittanawong, C., Fadelallah Eljack, M.M., Tahir, M.J., Waqar, F. (2023). Adverse events following COVID-19 mRNA vaccines: A systematic review of cardiovascular complication, thrombosis, and thrombocytopenia. *Immun Inflamm Dis*. 2023 Mar;11(3):e807. doi: 10.1002/iid3.807. PMID: 36988252; PMCID: PMC10022421. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36988252/>
- Yun, C.H., Bae, C.S., & Ahn, T. (2016). Cargo-Free Nanoparticles Containing Cationic Lipids Induce Reactive Oxygen Species

and Cell Death in HepG2 Cells - Biol Pharm Bull. 39(8):1338-46 <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00264>

Zaman, M., Good, M.F., Toth, I. (2013). Nanovaccines and their mode of action. *Methods*, 60(3), 226-231.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.04.014>

Avvertenza legale

Le informazioni presenti sul sito web e nell'**IJVTPR** non sono intese come diagnosi, trattamento raccomandato, prevenzione o cura per alcuna condizione umana o procedura medica eventualmente menzionata in qualsiasi forma. Gli utenti e i lettori che possano essere genitori, tutori, caregiver, clinici o parenti di persone interessate da una qualsiasi delle condizioni morbose, procedure o protocolli eventualmente richiamati devono avvalersi del proprio giudizio in merito alle applicazioni specifiche. Gli autori collaboratori, i redattori e le persone associate a qualsiasi titolo al sito web e/o alla rivista declinano ogni responsabilità nei confronti di qualsiasi persona o entità per danni, perdite finanziarie, lesioni fisiche o altre conseguenze che possano derivare da qualsiasi uso o applicazione, in qualsiasi contesto, di informazioni, conclusioni, risultati della ricerca, opinioni, errori o affermazioni rinvenibili sul sito web o nell'**IJVTPR**. Il materiale presentato è liberamente offerto a tutti gli utenti che possano avere interesse a esaminarlo, ma il modo in cui essi scelgano di applicarne qualsiasi parte resta di esclusiva responsabilità del lettore/utente. In caso di citazione o ristampa del materiale, si richiede agli utenti di attribuire il dovuto credito alla fonte/autore e di conformarsi ai requisiti di uso non commerciale e di divieto di opere derivate previsti dalla [Licenza Creative Commons 4.0 NC ND](#).

TRADUZIONE NON UFFICIALE

Ad uso interno

N.B. Il numero di pagina della traduzione italiana non necessariamente corrisponde al numero di pagina del testo originale inglese